

樹木のケミカル・コミュニケーション (III)

—シス-3-ヘキセン-1-オール雰囲気下のシラカンバ葉で 増加したフェノール成分—

菅原 亮*・鮫島正浩*・佐分義正*
渡邊定元**・石井克明***

Chemical Communication in Trees (III)

—An increasing phenolic constituent in Japanese white birch leaves under the *cis*-3-hexen-1-ol condition—

Ryo SUGAWARA*, Masahiro SAMEJIMA*, Yoshimasa SABURI*,
Sadamoto WATANABE** and Katsuaki ISHII***

I. はじめに

自然界において、高等植物は動物のように生活の場を変えることが出来ない。温度、光、降水量などの気象条件や土壌条件により、生育に適した場所は限られてくる。そこで他の動植物との間で、相互作用が起こりやすい。

なかでも植物と植物の間の相互作用には、栄養、水、光に対する競争や物理的あるいは生物学的な間接的干渉作用などがあり(藤井, 1990)、環境のストレスの影響や感受性、抵抗性および免疫性の相互関係などから論じられてきた(高橋編, 1984)。さらに、化学物質を介した相互作用, すなわちアレロパシー (allelopathy, 他感作用) が最近注目されてきている。もともとある種の植物が特定の代謝産物を出して、近接する同種あるいは他種の植物の生活を脅かす現象は古くから知られていた (SCHILDKNECHT, 1981)。

MOLISCH (1937) によって「ある植物が生産する化学物質により、他の植物がなんらかの作用を受ける現象」と定義されたアレロパシーの概念には、現在、植物間の阻害作用のみを対象とする場合 (GRUMMER, 1955; RICE, 1984) から、微生物から動物までの相互間で、阻害から促進作用までを含む場合 (藤井・安田, 1987) もある。

RICE (1984) によるとアレロパシーの作用機構として、細胞分裂、生長に作用、植物ホルモンの作用に影響、膜の透過性に影響、養分吸収に関与、光合成、呼吸やエネルギー代謝に影響、一次代謝産物の合成に影響、特定の酵素の阻害があげられている。すべての生化学反応に関わっているように見える。

一般にアレロパシーを示す原因物質が植物から排出されて周辺の植物に作用を及ぼすには、次

* 東京大学農学部林産学科
Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

** 東京大学農学部附属演習林研究部
Research Division of the University of Forests, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

*** 農林水産省森林総合研究所
Forestry and Forest Products Research Institute.

のような経路が考えられている (TUKEY JR., 1969)。

- 1) 葉や茎あるいは他の部位が地上に落ち蓄積され、風化と土壤微生物により分解され、その二次生産物が近くの植物に影響を与える。
- 2) 植物体から代謝産物が揮発性成分として放出され、影響を与える。
- 3) 根や地下茎から土壤に特定の代謝産物が滲出され、そのまま、あるいは土壤中で微生物によって変化を受け、他の植物に影響を与える。
- 4) 雨や露や霧によって植物の地上部から滲出され、影響を与える。

このうち 2) については植物ホルモンであるエチレンが挙げられる (下川, 1988)。果実の成熟がエチレンで促進され、かつエチレンがリンゴの果実で生成されていることからアレロパシーを説明する化合物としてよく知られている (藤井, 1990)。エチレンは物理的傷害のほか、水の欠乏、浸水、加熱、ウィルスの感染、亜硫酸ガスやオゾンの曝気、金属イオン (Cu^{2+} , Cd^{2+} など) との接触など、さまざまなストレスによって植物体内で生成が促進される (松岡, 1990)。

BALDWIN and SCHULTZ (1983) によるとポプラやサトウカエデの葉を引き裂くと、その傷つけられた葉中のフェノール量およびタンニンの濃度が上昇した。これらが増加することによって、傷の治癒が促進される、殺菌性のフェノールによって傷害部分からの細菌の侵入を防ぐ、苦味を増すことより昆虫の摂食を防ぐ、などの効果が考えられ、傷を受けた植物の合理的な応答であると考えられる (松岡, 1990)。

さらに、直接傷害を受けていない近くにある別の植物体の葉中のフェノール量やタンニン類の含有量も増加していた。これは傷害を受けた植物から大気を通じてケミカルコミュニケーションが行われたことによるとしている。

しかし食害葉や同じ個体の葉、隣接木の葉が防御物質を生産するとする説 (FEENY, 1970; HAUKOIOJA, 1980; ROSSITER *et al.*, 1988; WRATTEN *et al.*, 1984) に対して、これを疑問とする説 (CHAPIN *et al.*, 1985; FOWLER *et al.*, 1985; MYERS and WILLIAMS, 1984; WILLIAM and MYERS, 1984) も提示されており、これまで必ずしも見解は一致していない。

気相下で揮発性物質が植物の同種個体間や同一個体間 (例えば同一個体の葉と葉) の情報伝達に関与していることを実証した報告は、エチレンを例外としてほとんどない。

筆者らのうち渡邊ら (1990) は、永年固着生物である樹木は昆虫などに攻撃され危険にさらされたとき、ある特定のアレロケミカルズ (アレロパシーの原因物質) を発信し、それに対する応答が行われていると想定して、シラカンバとマイマイガを材料として、樹木のケミカル・コミュニケーションの実験を行った。この結果、シラカンバ葉がマイマイガに摂食された場合に葉中で増大し、かつ気相中に発散される物質の一つが *cis*-3-hexen-1-ol であったことから、この物質をケミカル・コミュニケーション物質の一つであると想定した。本研究は、①虫の摂食を受けた場合等の特定エコモンを発するケミカル・コミュニケーションを証明するための、葉のフェノール性成分量を測定するための実験方法の確立、② *cis*-3-hexen-1-ol の雰囲気下および葉の切断された場合におけるフェノール性成分量の変化、③ *cis*-3-hexen-1-ol の雰囲気下で増大した特定のフェノール成分の構造決定についての結果を報告する。

II. 材料および方法

1. 供試体の育成

著者らが行った実験（未発表）では、野外に生育しているシラカンバ、ミズナラ、ポプラの葉中のフェノール成分量は、同一個体の隣接葉間で変動が大きかった。T. BALDWIN ら (1983) が植物のケミカル・コミュニケーションについて発表して以来、虫の摂食を受けた植物個体の隣接葉にフェノール、タンニンが増大することについての、決定的な証明ができなかったことの原因の一つとして、個葉ごとのフェノール成分量に違いがあり、隣接葉を対照区とすることができなかったことにあると考える。

また、実験は、*cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気や切断などの傷害による刺激を葉に与えるので、実験のためにはそれ以外の刺激が除かれている材料を用いる必要があった。そこで、筆者らは、①遺伝的にみて均質であり、②季節に左右されず、③培地、光条件、温度・育成期間などの条件が同一であり、④他種の刺激によって葉にたいする影響をうけていない実験材料として、マイクロプロパゲーションにより育成したクローンを用いた。

マイクロプロパゲーションとは、植物体の一部の組織片を無菌培養することによって、親植物（培養に供した植物体）と遺伝子の等しい植物体を短期間に大量に生産することである（斉藤，1987）。また、マイクロプロパゲーションによる増殖に生長点組織を用いると遺伝的安定性がきわめて高く、増殖が容易となる。

そこで、森林総研千代田試験地で植栽している長野県産シラカンバをマイクロプロパゲーションによって育成した無菌の幼植物体（シュート長約 5 cm）を供試体として用いることとした。シラカンバ幼植物体のシュート伸長には IS 培地 (SAITO, A. and Y. IDE, 1985) を用い、発根は、改変 MS 培地 (SAITO, A. and Y. IDE, 1985) を 200 ml のコニカルビーカーに 70 ml ずつ分注したものをを用いた。これらの二つの培地の組成は Table 1 のとおりである。

2. シラカンバ葉の処理条件

(1) *cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気下でのシラカンバ幼植物体葉の暴露条件ならびにシラカンバ葉の切断・切断隣接葉の処理条件は、次のとおりとした。

シラカンバ幼植物体は、移植後 3 カ月のものとし、1 処理区 6 個体ずつとした。処理は、

- ① 対照区：無処理のもの。
- ② *cis*-3-hexen-1-ol を 6 条件の濃度で揮発させたもの：*cis*-3-hexen-1-ol 0.001 μ l, 0.01 μ l, 0.1 μ l, 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l を滴下した濾紙を幼植物体を育成したビーカー中に入れ、24 時間暴露したもの。なお 0.1 μ l 以下では DMSO 10 μ l に希釈したものによった。
- ③ 切断葉：同一個体全ての葉について葉身の半分を切断し、24 時間放置したもの。
- ④ 切断葉の隣接葉：同一個体内の 2 枚の葉の葉身を半分に切断し、24 時間放置したのち、切断葉に隣接する正常な葉。

(2) *cis*-3-hexen-1-ol の 1 μ l (5 ppm) 雰囲気下での葉のサイズ別全フェノール量および増加フェノール成分の特定のためのシラカンバ葉の処理条件は、次のとおりとした。幼植物体の材料と処理区は、(1) と同様である。

- ① 対照区 A：葉身長が 4 cm を越える葉のある幼植物体について、4 cm 以上の葉。

表-1 シラカンバの幼植物体の培養に用いた培地組成
Table 1. Medium composition for the cultivation of *Betula plantyphylla*

	発根培地 Rooting medium (modified MS)	シュート伸長培地 Shoot growth medium (IS)
NH ₄ NO ₃	1600 (mg/l)	680
KNO ₃	1300	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	80
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9	8.6
H ₃ BO ₃	3.2	3.2
KI	0.8	0.8
KCl	—	140
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	—	140
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	710	710
K ₂ SO ₄	420	—
Fe-EDTA-Na	20	—
Fe-EDTA	—	85
myo-Inositol	100	100
Pyridoxine-HCl	0.1	0.1
Thiamine-HCl	0.1	0.1
Nicotinic acid	0.5	0.8
Fumaric acid	—	1
Ascorbic acid	—	1
Urea	—	10
sym-Diphenylurea	—	3
Lysine	100	100
Tyrosine	—	10
Saccharose	20000	20000
Agar	10000	3000
IBA	0.5	—
NAA	0.0186	—
BAP	0.00225	0.8
pH	5.8	5.7

- ② 対照区 B: 葉身長が 4 cm を越える葉のある幼植物体について、4 cm 未満の葉。
- ③ 切断葉 A: 葉身長が 4 cm を越える葉のある幼植物体について、全ての葉にはさみで切り目を入れ、24 時間後に 4cm 以上の葉のみを選び出したもの。
- ④ 切断葉 B: 葉身長が 4 cm を越える葉のある幼植物体について、全ての葉にはさみで切り目を入れ、24 時間おいた 4 cm 未満の葉のみを選び出したもの。
- ⑤ *cis*-3-hexen-1-ol 1 μ l A: 葉身長が 4 cm を越える葉のある幼植物体について、ビーカー中に *cis*-3-hexen-1-ol 1 μ l をそのまま滴下した濾紙を入れ、24 時間暴露した 4 cm 以上の葉。
- ⑥ *cis*-3-hexen-1-ol 1 μ l B: 葉身長が 4 cm を越える葉のある幼植物体について、ビーカー中

に *cis*-3-hexen-1-ol 1 μ l をそのまま滴下した濾紙を入れ、24 時間暴露した 4 cm 未満の葉。

- ⑦ 対照区 C: 葉身長が 4 cm を越える葉のない幼植物体についての全葉。
- ⑧ 切断葉 C: 葉身長が 4 cm を越える葉のない幼植物体について、全ての葉にはさみで切り目を入れ、24 時間暴露した全葉。
- ⑨ *cis*-3-hexen-1-ol 1 μ l C: 葉身長が 4 cm を越える葉のない幼植物体について、ビーカー中に *cis*-3-hexen-1-ol 1 μ l を滴下した濾紙を入れ、24 時間暴露した全葉。

3. フェノール成分・フラバノール成分の定量ならびに増大したフェノール成分の分析

供試体の葉身のみを切り取り、全て 10 ml のメタノールに 24 時間浸漬したのち、ホモジナイズして濾別後、メタノール抽出液を得た。

メタノール抽出液はスクリー管に保管し、Folin Denis 法 (SWAIN and HILLS, 1959) によるメタノール可溶の全フェノール成分の定量、バニリンー塩酸法 (BROADHURST and JONES, 1978) によるフラバノールの定量を行った。

全フェノール成分の定量は、純水で 50 倍に希釈した抽出液 500 μ l, Folin Denis 試薬 500 μ l および 10%w/v 炭酸ナトリウム水溶液 500 μ l を試験管にとり、パラフィルムで口を閉じて振りまぜ、30 分間静置した後、700 nm における吸光度を測定した。対照液には抽出液の代わりに蒸留水を入れて、同様にしたものを用いた。

フラバノールの定量は、抽出液 150 μ l, 4%w/v バニリン・メタノール溶液 900 μ l, および 12 N 塩酸水溶液 450 μ l を共栓付き試験管にとりアルミホイルで光を遮り混合した。15 分間暗所に静置した後、500 nm における吸光度を測定した。対照液には抽出液の代わりに蒸留水を入れて、同様にしたものを用いた。

さらに、メタノール抽出液 (10 ml) をエバポレーターで濃縮乾固させたのち、ごく少量のエタノールに再懸濁し、これをパスツールピペットで作ったシリカゲルミニカラム (0.5 ϕ ×2 cm) にチャージし、1.5 ml のベンゼンで脂質成分を溶出させたのち、10 ml のアセトンでフェノール成分を溶出させた。アセトン溶出部のうち 200 μ l をとって、アセトンを窒素ガスでとばした後、20 μ l のエタノールにフェノール成分を再溶解させ、そのうち 10 μ l を以下に示す条件で高速クロマトグラフィーにより分析した。分析機種: 島津 LC-3A, カラム: Cosmosil 5C 18-AR (4.5 ϕ ×150 mm), 検出: 280 nm (0.02/フルスケール), 流量: 0.8 ml/min, 溶出容媒: アセトニトリル/0.05% トリフロロ酢酸水 (10/90-2%/min-30/70-5%/min-100/0)。

4. フェノール成分の単離と同定

cis-3-hexen-1-ol 雰囲気下のシラカンバ葉中で増加したフェノール成分の単離と同定は次の方法によった。

農林省森林総合研究所研千代田試験地内において、幼植物体を得たものと同じ系統であるシラカンバ成木から生重量 182.5 g の葉を採取し、ただちに 1800 ml のメタノールに 24 時間浸漬した。室温下で 24 時間放置した後、ポリトロンで破碎し、抽出液を濾別した。メタノール抽出液中の全フェノール成分量は、生重量当り 2.64% であった。メタノールをロータリーエバポレーターで留去し、得られた個体 21.7 g を 10 ml のエタノールに再懸濁させた。エタノール不溶部を濾別

表-2 シス-3-ヘキセン-1-オール処理によるシラカンバ幼植物体の葉生重量あたりのフェノール成分量ならびにフラバノール量の相対変化

Table 2. Relative changes of phenol and flavanol contents per the fresh weight of leaves from the seedlings of *Betula platyphylla* by *cis*-3-hexen-1-ol treatment

	シス-3-ヘキセン-1-オール処理区 <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol treated						対照区 Control
添加したシス-3-ヘキセン-1-オール量 Volume of <i>cis</i> -3-hexen-1-ol added (μ l)	0.001	0.01	0.1	1	10	100	0
フェノール相対量 Relative phenol content							
平均値 Average	108	92	91	152	94	92	100
標準偏差 Standard deviation	28	48	23	43	26	15	55
フラバノール相対量 Relative flavanol content							
平均値 Average	93	98	106	110	109	115	100
標準偏差 Standard deviation	12	34	32	24	11	31	15

し、エタノール可溶部 (10.1 g) を得た。エタノール可溶部をシリカゲルカラム (0.5×2 cm) にチャージし、ベンゼンならびにアセトンの順で溶出させた。アセトン溶出部 (0.6 g) から前述の高速液体クロマトグラフィー条件下で保持時間 6.2 分を与える化合物 (138 mg) を分取用カラム Cosmosil (20 ϕ ×250 mm) を用いて、3 の場合と同一の溶出条件で単離した。単離した化合物の化学構造を MS ならびに NMR で分析した。MS は JEOL DX-303 (EI, 70 eV) によって、また NMR は Bruker AC300 によって測定した。NMR 測定容媒は d_4 -メタノールを用いた。

III. 結果および考察

マイクロプロパゲーション法によりシュート伸長倍地から無菌的に株分けし、3 カ月間発根倍地中で培養したシラカンバ幼植物体を種々の濃度 *cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気下においた個体と無処理の個体での、葉中のフェノール成分量ならびにフラバノール量の違いを Table 2 に示す。無処理のものあるいは同一濃度で処理した個体間でもフェノール成分量、フラバノール量ともに大きなバラツキが認められた。平均ならびに分散について統計処理を行ったところ、無処理のもの (対照区) に対して、試験個体 (コニカルビーカー) について 1 μ l の *cis*-3-hexen-1-ol を揮発させたもののみで著しいフェノール成分量の増加が認められ、有意な差があった。しかしながら、フラバノール量についてはまったく有意な差は認められなかった。このことから、特定濃度の *cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気下でのシラカンバ幼植物体の葉ではフェノール成分量が増大することが認められた。

濾紙に含浸させた 1 μ l の *cis*-3-hexen-1-ol は全量が気化し、コニカルビーカー内に広がったとすると 5 ppm に相当する。しかしながら、揮発成分である Linalool を用いた容器内の成分変化を調べた実験 (渡邊ら, 1990) では、初期濃度が 8.2 ppm のものが 24 時間後には 10% 以下に、

表-3 切断処理によるシラカンバ幼植物体の葉生重量あたりのフェノール成分量ならびにフラバノール量の相対変化

Table 3. Relative changes of phenol and flavanol contents per the fresh weight of leaves from the seedlings of *Betula platyphylla* by cutting treatment

	切断処理区 Leaves cut-treated	切断処理隣接区 Leaves adjacent to leaves cut-treated	対照区 Control
フェノール相対量 Relative phenol content			
平均値 Average	112	98	100
標準偏差 Standard deviation	59	36	55
フラバノール相対量 Relative flavanol content			
平均値 Average	102	93	100
標準偏差 Standard deviation	36	38	15

表-4 切断処理ならびにシス-3-ヘキセン-1-オール処理がシラカンバ幼植物体の葉生重量あたりのフェノール成分量（重量パーセント）に与える影響

Table 4. The effects of cutting or *cis*-3-hexen-1-ol treatment on phenol content (%) per the fresh weight of leaves from the seedlings of *Betula platyphylla*

	4 cm 以上の葉を有する幼植物体 Seedling with leaves more than 4 cm		4 cm 以上の葉を有さない幼植物体 Seedling without leaves more than 4 cm
葉長 (Length of leaves)	>4 cm	≤4 cm	≤4 cm
対照区 (Control)			
平均値 (Average)	0.54	1.12	0.89
標準偏差 (Standard deviation)	0.05	0.55	0.38
切断処理区 Cutting treated			
平均値 (Average)	0.55	0.91	0.69
標準偏差 (Standard deviation)	0.15	0.41	0.06
シス-3-ヘキセン-1-オール処理区 <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol treated			
平均値 (Average)	0.76	0.90	0.82
標準偏差 (Standard deviation)	0.47	0.20	0.28

また初期濃度が 42.4 ppm のものでは 2% 以下に減少していることが明らかにされている。これらの実験より推定すると、本実験の *cis*-3-hexen-1-ol の場合も容器内の濃度は減少し、最終的な容器内の濃度は 1 ppm 以下になっているものと思われる。

一方、Table 3 に示すように、切断葉は、BALDWIN ら (1983) の指摘のとおりフェノール量の平均の値は増加したが、この実験では有意な差があるとは認められなかった。切害隣接葉の葉では

表-5 切断処理ならびにシス-3-ヘキセン-1-オール処理がシラカンバ幼植物体の葉生重量あたりのフラバノール成分量（重量パーセント）に与える影響

Table 5. The effects of cutting or *cis*-3-hexen-1-ol treatment on flavanol content (%) per the fresh weight of leaves from the seedlings of *Betula platyphylla*

	4 cm 以上の葉を有する幼植物体 Seedling with leaves more than 4 cm		4 cm 以上の葉を有さない幼植物体 Seedling without leaves more than 4 cm
葉長 (Length of leaves)	> 4 cm	≤ 4 cm	≤ 4 cm
対照区 (Control)			
平均値 (Average)	0.17	0.34	0.28
標準偏差 (Standard deviation)	0.04	0.16	0.11
切断処理区 Cutting treated			
平均値 (Average)	0.24	0.33	0.32
標準偏差 (Standard deviation)	0.10	0.14	0.07
シス-3-ヘキセン-1-オール処理区 <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol treated			
平均値 (Average)	0.26	0.36	0.28
標準偏差 (Standard deviation)	0.12	0.07	0.09

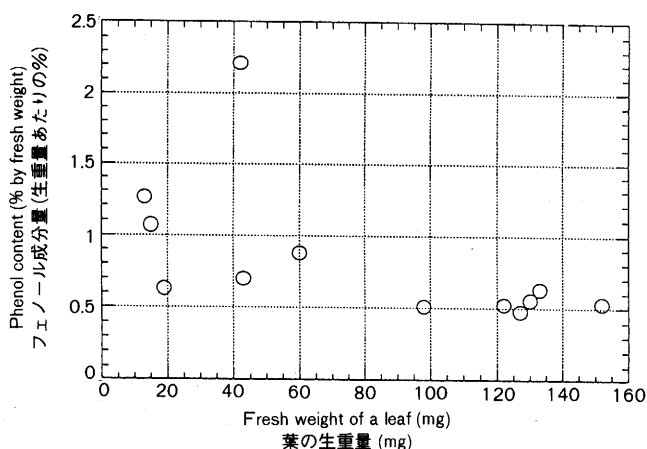


図-1 シラカンバ幼植物体葉中のフェノール成分量との関係

Fig. 1. Relationships between phenol content of leaves of *Betula platyphylla* seedlings.

フェノール量の変化は少なかった。

なお、予備実験としてミズナラの実生について同様の解析を行ったが、植物体および葉ごとのフェノール成分のばらつきが大きかった。本実験でのマイクロプロパゲーションによる、同一クローン個体の葉でも、フェノール量に変動が認められたことは、実験材料の均一化を図ることが必要である。個葉ごとのフェノール成分量の変動幅が小さく一定している実験材料の探索は、本研究の目的の一つである。そこで、マイクロプロパゲーションにより一定期間育成した個体の葉身サイズに着目して葉身サイズ別フェノール性成分量を定量し、また、増加したフェノール性成

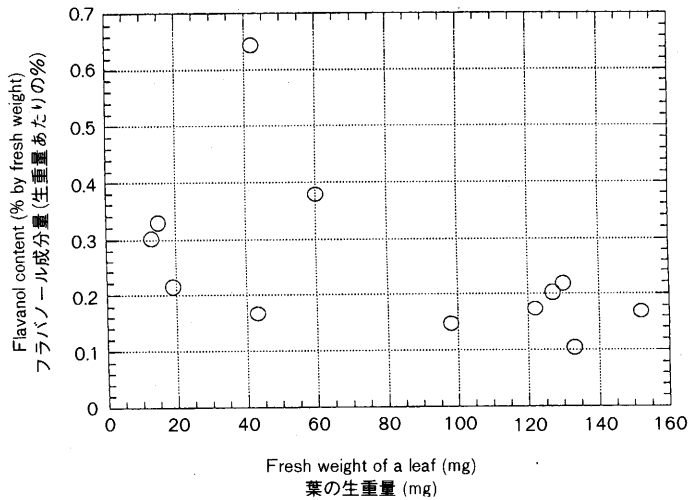
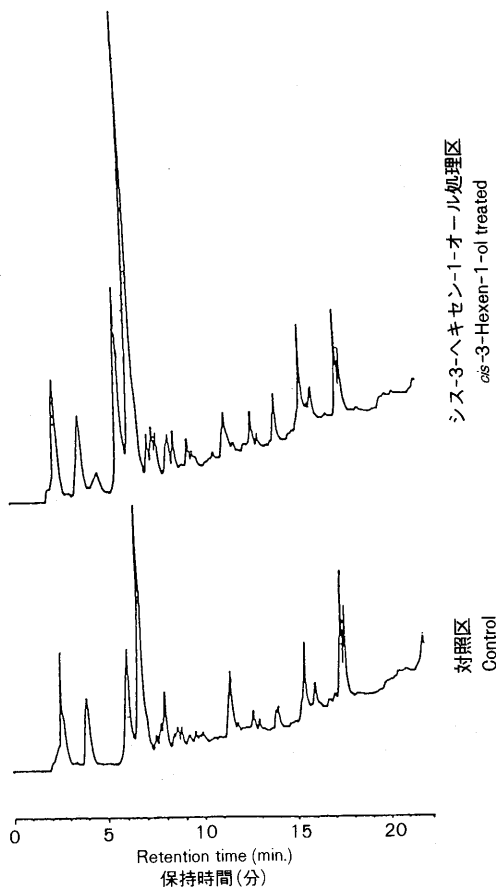


図-2 シラカンバ幼植物体葉中のフラバノール量との関係

Fig. 2. Relationships between flavanol content of leaves of *Betula plantyphylla* seedlings.



分について特定することとした。

そこで、葉身長が4 cm以上の葉を有する個体について葉身長が4 cm以上のものと未満のものを仕分けし、また、葉身長が4 cm未満の個体はすべての葉をまとめて、フェノール成分量ならびにフラバノール成分量を定量した。

Table 4 および Table 5 のとおり、*cis*-3-hexen-1-ol 無処理の対照区では、フェノール成分量ならびにフラバノール量ともに、葉身長が4 cm以上の葉では4 cm未満の葉に比べて明らかに少なかった。4 cm以上の葉ではその生重量が98 mg以上で、一方、4 cm未満の葉では60 mg以下であった。葉の生重量を横軸に、またフェノール成分量あるいはフラバノール量を縦軸にとったのが、Fig. 1 および Fig. 2 である。このことから、マイクロプロパゲーションによるクローン個体では葉の生長段階に伴っ

図-3 シラカンバ幼植物体葉のメタノール抽出物の高速液体クロマトグラム

Fig. 3. High performance liquid chromatogram of methanol extracts from leaves of *Betula plantyphylla* seedling.

表-6 切断処理ならびにシス-3-ヘキセン-1-オール処理がシラカンバ幼植物体の葉生重量あたりの 3,4'-ジヒドロキシプロピオフェノン-3-β-D-グルコシド量 (ppm) に与える影響

Table 6. The effects of cutting or *cis*-3-hexen-1-ol treatment on 3,4'-dihydroxypropiofenone-3-β-D-glucopyranoside content (ppm) per the fresh weight of leaves from the seedlings of *Betula platyphylla*

	4 cm 以上の葉を有する幼植物体 Seedling with leaves more than 4 cm		4 cm 以上の葉を有さない幼植物体 Seedling without leaves more than 4 cm
葉長 (Length of leaves)	> 4 cm	≤ 4 cm	≤ 4 cm
対照区 (Control)			
平均値 (Average)	46	100	100
切断処理区 Cutting treated			
平均値 (Average)	53	300	60
シス-3-ヘキセン-1-オール処理区 <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol treated			
平均値 (Average)	230	270	270

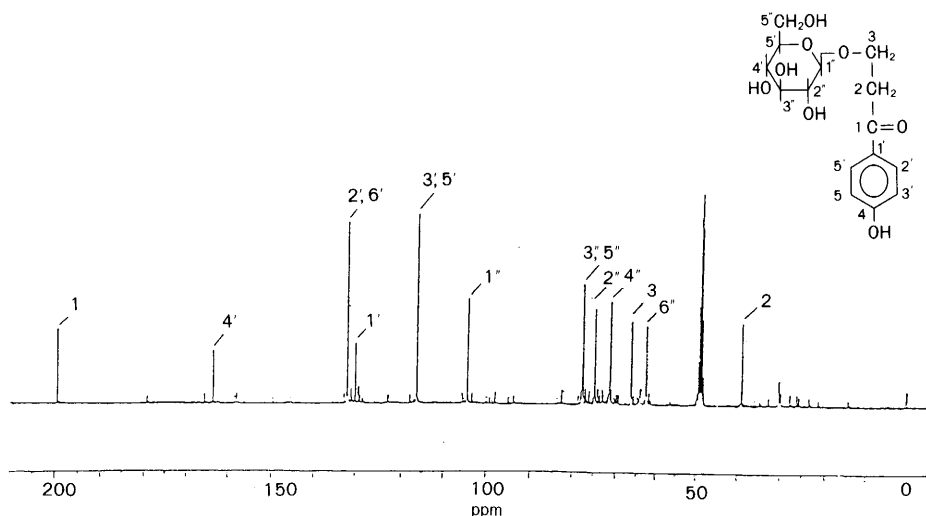


図-4 高速液体クロマトグラム上で保持時間 6.2 分を与えた化合物の ¹³C-NMR スペクトラム

Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of the chemical component with 6.2 min. of retention time on the high performance liquid chromatogram.

て、生重量当たりのフェノール成分量ならびにフラバノール量が減少し、葉身サイズ 4 cm 以上でフェノール成分量が一定となることが明らかとなった。また、筆者の一人、渡邊は、シラカンバの成長点に近い完全に展葉しきっていない若い葉は、マイマイガ幼虫の摂食を受けない特徴を観察しているが、若い葉が摂食を受けないのはフェノール成分が多いことに関係するものと推定される。*cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気下で、シラカンバ葉中のフェノール成分量、フラバノール量ともに 4 cm 未満の葉では有意な差は認められなかったが、葉身長が 4 cm 以上の葉では対照区にく

らべて有意な差をもって増加していた (Table 4, 5)。

高速クロマトグラフィーによるフェノール成分の分析では、保持時間 6.2 分にピークを与える化合物は著しい個体差が認められた。ピーク面積には最高と最低で 50 倍以上の差があったが、フェノール成分の場合と同様に葉の大きさによって有意な差が認められ、葉長が 4 cm 以上の葉ではそれ未満のものに比べて明らかに小さかった。

また、*cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気下の個体では、対照区に比べて保持時間 6.2 分にピークを与える化合物の明らかな増加が認められた (Fig. 3)。この化合物のピーク面積をとったところ、葉の大きさによらず対照区にくらべ *cis*-3-hexen-1-ol 雰囲気下のものでは有意な差をもって増加していた (Table 6)。このようなことから、*cis*-3-hexen-1-ol は明らかにこの化合物の変化に関与している可能性が高いものと推定された。

高速クロマトグラフィーで保持時間 6.2 分を与える化合物の化学構造を同定する目的で、マイクロプロバゲーションによる実験で用いたシラカンバと同一系統の成木からの葉をメタノール抽出し、シリカゲルカラムならびに分取用逆相カラムクロマトグラフィーを組み合わせ本化合物の単離を行った。

この化合物は Folin-Denis 試薬によって青色を呈する。したがって、フェノール性水酸基を有することが判明した。この化合物は EI-MS ならびに FAB-MS において明瞭な分子イオンピークを与えなかったが、 ^{13}C -NMR スペクトルはフェニルプロパノイドのグルコシドであることを示していた (Fig. 4)。すなわち、Fig. 4 の 63.7, 69.5, 72.9, 75.7 ならびに 102.4 ppm に観測されるシグナルはグルコース残基に由来するものと帰属される。また、114.9, 127.2, 130.1 ならびに 163.4 ppm に観測される芳香環由来のシグナルは 4 位が 1 水酸基によって置換された構造を有していることを示している。さらに、37.2 ppm に観測されるシグナルはメチレン基の存在を、64.4 ppm のシグナルは第一アルコール (あるいはエーテル) の存在を、また 197.4 ppm のシグナルはケトン存在を示している。この化合物 (74 mg) を 10 mg の β -グルコシターゼで酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中、35°C で 48 時間処理すると、完全に酵素分解されることが高速液体クロマトグラフィーで確認された。得られたアグリコン (32 mg) は分子イオンピークを 166 (M/Z) に与えた。また、121 (M/Z) に主要なフラグメントピークが観測されることから、ケトン芳香環に共役する 1 位に存在することが明らかとなった。以上のことから、得られたアグリコンの構造は (4'-hydroxyphenyl)-1-propanone であると推定された。さらに β -グルコシターゼによって元の化合物が加水分解されること、グルコース残基の 1'' 位のシグナルを 105 ppm に与えることなどから、高速液体クロマトグラフィーで保持時間 6.2 分を与える化合物は (3,4'-dihydroxypropiophenone-3- β -D-glucopyranoside (DHP-Glu) であると推定した。本化合物は、最近になって森ら (1992) によって有機合成され、その構造が確認された。なお、DHP-Glu は、R. TSCHESHE ら (1974) によって *Betula alba* の葉から単離されている。シラカンバにおいても、その存在が寺沢ら (1976) により報告されている。

本化合物がマイマイが幼虫などの摂食や成長などに及ぼす影響は今後の課題である。

謝 辞

本研究を行うにあたり指導、助言をいただいた東京大学農学部善本知孝名誉教授ならびに寺田珠実助手に謝意を表す。また、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金課題番号 02806028、な

らびに(財)自然農法国際研究開発センターによる助成金によった。

要 約

cis-3-hexen-1-ol 雰囲気下でのシラカンバの幼植物体の葉中のフェノール成分について調べた。マイクロプロパゲーションによって増殖させたシラカンバ幼植物体を培養したコニカルビーカーに、適当量の *cis*-3-hexen-1-ol を含浸させた濾紙を入れ、24 時間のガス処理したものの葉をメタノール抽出し、無処理のものに対するフェノール成分の変化を調べた。その結果、フェノール成分量の明らかな増加が認められた。さらに、高速液体クロマトグラフィーによる分析により、*cis*-3-hexen-1-ol によって増加するフェノール性化合物が検出された。この化合物を単離し、MS ならびに NMR によって化学構造を調べた結果、3,4'-dihydroxypropiofenone-3- β -D-glucopyranoside であることが確認された。

キーワード: ケミカル・コミュニケーション, アレロパシー, シラカンバ, フェノール性抽出成分, *cis*-3-hexen-1-ol

引 用 文 献

- BALDWIN, I. T. and J. C. SCHULTZ: Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage. *Science*, **221**, 277-279, 1983.
- BROADHURST, R. B. and W. T. JONES: Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 788-794, 1978.
- CHAPIN, F. S., J. P. BRYANT and J. F. FOX: Lack of induced chemical defense in juvenile Alaskan woody plants in response to simulated browsing. *Oecologia*, **67**, 457-459, 1985.
- FEENEY, P.: Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring teething by winter moth Caterpillars. *Ecology*, **51**, 565-581, 1970.
- FOWLER, S. V. and J. H. LAWTON: Rapidly induced defenses and talking trees. *Am. Nat.*, **126**, 181-194, 1985.
- 藤井義晴: 植物のアレロパシー. *化学と生物*, **28**, 471-478, 1990.
- : 安田 環: ふんせき, **148**, 231, 1987.
- GLLIARD, T. and H. W. S. CHAN: *The Biochemistry of Plants*. 4. ed. by P. K. Stumpf. Academic Press. New York. 131 pp.
- GRUMMER, G.: "Die gegenseitige Beeinflussung hoherer Pflanzen-Allelopathie." 162 pp. Fischer, Jena. 1955.
- HATANAKA, A., M. IMOTO and S. INOUE: Participation and properties of lipoxygenase and hydroperoxidase lyase in volatile C₆-aldehyde formation from C₁₈-unsaturated fatty acids in isolated tea chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 91-99, 1982.
- HAUKIOJA, E.: On the role of plant defences in the fluctuation of herbivore populations. *Oikos*, **35**, 202-213, 1980.
- 松岡英明: 植物の情報伝達. *生命情報工学*. 161-178. 裳華房. 1990.
- MOLISCH, H.: "Der Einfluss einer Pflanze auf die andere. Allelopathie." 106 pp. Fischer, Jena. 1937.
- MORI, K., Z.-H. QIAN, and S. WATANABE: 3,4'-Dihydroxy-propiofenone-3- β -D-glucopyranoside, a constituent of *Betula platyphylla*. *Liebigs Ann. Chem.*, **1992**, 485-487, 1992.
- MYERS, J. H. and K. S. WILLIAMS: 1984. Does tent caterpillars attack reduce the food quality of red alder foliage?. *Oecologia*, **62**, 74-77, 1984.
- RICE, E. L.: *Allelopathy*. Academic press. 2nd ed. 422 pp. 1984.
- ROSSITER, M., J. C. SCHULTZ and I. T. BALDWIN: Relationships among defoliation; Red oak phenolics, and gypsy moth growth, and reproduction. *Ecology*, **69**, 267-277, 1988.
- SAIJO, R. and T. TAKEO: The importance of linoleic acid and linolenic acid as precursors of hexanal and

- trans-2-hexenal in black tea. *Plant Cell Physiol.*, **13**, 991-998, 1972.
- 斎藤 明: マイクロプロパゲーションによる林木種苗の大量供給組織培養, **13**, 296-299, 1987.
- SAITO, A. and Y. IDE: In vitro plantlet regeneration from adventitious buds induced by petiole culture in Japanese white birch. *J. Jpn. For. Soc.*, **67**(9), 373-375, 1985.
- SCHILDKNECHT, H.: Irritant and defense substances of higher plants—A chemical herbarium. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 164-184, 1981.
- 関谷次郎: 高等植物の茎葉器官分化と緑葉における香気成分生成に関する研究. *日本農芸化学会誌*, **59**, 1161-1169, 1985.
- SEKIYA, J., T. KAJIWARA, K. MUNESHIKA and A. HATANAKA: Distribution of lipoxygenase and hydroperoxide lyase in the leaves of various plant species. *Phytochemistry*, **22**, 1867-1869, 1983.
- , ——— and A. HATANAKA: Seasonal changes in activities of enzymes responsible for the formation of C₆-aldehydes and C₆-alcohols in tea leaves and the effects of environmental temperature on the enzyme activities. *Plant Cell Physiol.*, **25**, 269-280, 1984.
- , S. TANIGAWA, T. KAJIWARA and A. HATANAKA: Fatty acid hydroperoxide lyase in Tobacco cell cultured in vitro. *Phytochem.*, **23**, 2439-2443, 1984.
- 下川敬之: エチレン. 東京大学出版会, 130 pp. 1988.
- SWAIN, T. and W. E. HILLS: The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. —The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 63-69, 1959.
- 寺沢 実・野島一晃・奥山 寛・三宅基夫: シラカンパ生活組織のフェノール成分. 第26回日本木材学会大会研究発表要旨集, 234, 1976.
- TSCHESHE, R., A. HARZ and G. WULFF: 3,4'-dihydroxy-propiophenon-3-β-D-glucopyranosid aus *Betula alba*. *Phytochem.*, **13**, 518-519, 1974.
- TUKEY, H. B.: Jr., *Bot. Rev.*, **35**, 1, 1969.
- 植木邦和: 植物間相互作用と化学物質. 高橋信孝 (編). 文部省特定研究. 生物生産の場における生理的・化学的制御, 273-292. 研究成果報告書編集委員会, 1984.
- VICK, B. A. and D. C. ZIMMERMAN: Distribution of a fatty acid cyclase enzyme system in plants. *Plant Physiol.*, **64**, 203-205, 1979.
- 渡邊定元: カンパ属・シラカンパ亜属の冬芽精油成分と系統分化. 林分施業法のシステム化に関する研究 125-132. 文部省科学研究費研究成果報告書, 1989.
- ・井口和信・菅原 亮・石井 淳: 樹木のケミカル・コミュニケーション (I)—方法およびシラカンパについての予備試験—. **101** 回日林論, 367-369, 1990.
- : 樹木のケミカル・コミュニケーション (II)—シラカンパ類冬芽香気成分によるエンドウマメ発芽の生理活性—. **102** 回日林論, 505-507, 1991.
- WILLIAMS, K. S. and J. H. MYERS: Previous herbivore attack of red alder may improve food quality for fall web worm larval. *Oecologia*, **63**, 166-170, 1984.
- WRATTEN, S. D., P. J. EDWARDS and I. DUNN: Wound-induced changes in the palatability of *Betula pubescens* and *B. pendula*. *Oecologia*, **61**, 372-375, 1984.

(1992年3月17日受理)

Summary

The effects of *cis*-3-hexen-1-ol treatment on the changes of phenolic extractives in the leaves of *Betula platyphylla* var. *japonica* was investigated. Shoots prepared by micro-propagation were grown in a conical beaker for 3 months. The resultant plantlets were treated with the gas *cis*-3-hexen-1-ol for 24 hours and then the leaves were extracted with methanol. The phenolic components in the methanol extracts of the treated samples were compared with control samples. As a result, it was demonstrated that the gastreatment by *cis*-3-hexen-1-ol caused the total amount of phenolic component in the leaves to increase significantly.

Moreover, the increase of the specific phenolic compound resulting from the treatment was detected by HPLC analysis. This phenolic compound was isolated from the methanol extracts and identified as 3,4'-dihydroxy-propiophenone-3-β-D-glucopyranoside by MS and

NMR spectroscopy.

Key words: Chemical communication, Allelopathy, *Betula platyphylla* var. *japonica*, Phenolic extractives, *cis*-3-hexen-1-ol