[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 65, No. 10, pp. 1483~1488, 1991]

ハマナス葉中のカロタンセスキテルペン類の変動

橋床泰之, 岩谷紀子*, 田原哲士*, 水谷純也
(新技術事業団水谷プロジェクト, *北海道大学農学部)

平成3年5月2日受理

Changes in Carotane Sesquiterpenoids in *Rosa rugosa* Leaves

Yasuyuki HASHIDOKO, Noriko IWAYA*, Satoshi TAHARA*
and Junya MIZUTANI

JRDC Mizutani Plant Ecochemicals Project, Eniwa RBP Center Bldg.,
Megumino Kita 3-Chome, Eniwa-shi 061-13

* Department of Agricultural chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido
University, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

Quantitative levels of three major carotane sesquiterpenes, rugosal A (1), rugosic acid A (2) and carota-1,4-dienaldehyde (3) were determined in leaves of *Rosa rugosa* THUNB. Carota-1,4-dienaldehyde (3) increased during the budding and flowering stages, but drastically decreased after flowering. Compound 1 followed after 3 increased and was at a high level over flowering and ripening stages, and their concentrations were sufficient to suppress many fungi. Compound 2 accumulated through leaf maturation, and diminished in colored or falling leaves. Furthermore, leaf detaching or injury caused a rapid oxidation of 3 into 2 via 1. Compound 1 which is actively released from the tissues when the leaves were mechanically damaged and soaked in water seemed to originate mostly from compound 3 in tissues. (Received May 2, 1991)

北海道を含む極東アジアの海浜砂地に自生するハマナス (*Rosa rugosa* THUNB.) は、庭園に移植した場合、園芸バラ品種に対し広範な害をもたらす特定病虫害に対して高度に抵抗性を示すことで知られる。しかし、その抵抗性因子については現在のところほとんど研究されておらず、僅かに、ハマナスを含めた *Rosa* 属植物の葉中コレステロール量と感染抵抗性との負の相関を報告したものがあるに過ぎない⁽¹⁾。一方、ハマナス葉中には本植物の主要な抗菌性成分として、われわれが単離したカロタン型セスキテルペンバーオキンド rugosal A (1)⁽²⁾、本化合物のフォルミル基がカルボキシル基に酸化された rugosic acid A (2)⁽²⁾ および化合物 1 の前駆体 carota-1,4-dienaldehyde (3)⁽³⁾ が多量に含まれる。これまでにバラ科植物からセスキテルペン類を単離した例は極めて少なく、今のところハマナスは多様なセスキテルペ

ン類を高濃度で含む、特異なバラ科植物である⁽⁴⁾。著者らは、抵抗性因子との関連如何にかかわらず、これらカロタンセスキテルペン群が本植物でどのような経路で生成し、生理的役割を果たすのかについて興味を持っている。当初、傷害を与えた葉の水抽出物から単離された化合物 1 および 2 は、3 の検索過程で内在性成分として健全葉にも高濃度に含まれていることがわかった。さらに、被傷害葉からの化合物 1 遊離量が開花期に比べ結実期あるいは落葉期に著しく少ないことを見出し、化合物 1 およびその関連化合物含量の顕著な季節変動が示唆された。そこで萌芽期から落葉期にかけて、ハマナス葉中に内在する 1~3 の量を測定し、それらの長期的変動を追究するとともに、ストレス条件下におけるこれら 3 成分の短期的な変動を見た。化合物 1~3 の長期的動態に加え、傷害時に化合物 3 からの 1 への比較的速い変換

が起こることが示された。さらに、化合物 1 の傷害部からの高い特異的遊離機構が存在することも示唆された。以下にその定量結果、それにより得られた量的変動および傷害葉からの本化合物の選択的遊離に対する考察を示す。

実 験 の 部

1. 試料の調製

定量に用いたハマナス葉は北大構内および恵庭市郊外に定植されたものから採取した。葉の成熟に伴って複葉の主葉脈に対する葉片の相対重量比が大きく変化することおよび定量しようとする成分が主葉脈からはほとんど検出できないことから、定量対象は葉片部に限定した。無作為に採集した複葉から葉片を、葉片に傷を付けないようにカミソリ刃で注意深く切り離し、この葉片のうち食害等何らかのダメージのあるものを除く健全な群から再度無作為に 10.0 ± 0.05 g を秤量した。サンプルは酢酸エチル 100 ml で 1 週間冷暗所で抽出し、傾瀉により酢酸エチル抽出液を取り、さらに 50 ml の酢酸エチルで抽出残渣を洗った。この粗抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後 4 ml に濃縮し、冷凍庫で保存した。萌芽期から落葉期までの葉は 5~14 日おきに採集し、すべてのサンプル調製が終了してから分析を開始した。

2. 検量線の作成

Carota-1,4-dienaldehyde (3), rugosal A (1) および rugosic acid A (2) の定量分析にはそれぞれガスクロマトグラフィー、順相 HPLC、逆相 HPLC を用いた。標準液は 19.3 mg の化合物 3 を 250 ml *n*-ヘキサン溶液として調製した。これから 0.2, 0.5, 2.0, 5.0 ml をそれぞれ正確に取り、各々に内部標準液 (methyl palmitate 200.4 mg/500 ml *n*-ヘキサン) を 1 ml ずつ加えた。それぞれの混合液から溶媒を除去し、0.5 ml の酢酸エチルに再溶解して、各濃度について 3 度ずつガスクロ

マトグラフィー (PEG 20 M キャピラリーカラム 10 m, FID 検出器) で分析した。化合物 3 のピーク面積 (t_R 9.5 min) を内部標準のそれ (9.9 min) で割った値を縦軸に、標準液中の化合物 3 のミリモル数を横軸に取り、その勾配から 3 の RMR (relative molar response) 値を決定し、以下の定量に使用した。

化合物 3 と同様に rugosal A (1) 7.4 mg を 100 ml アセトンに溶かし、coumarin を内部標準として各濃度標準液を作成した。分析は順相 HPLC (Unisil Q 100-5, 2% EtOH/*n*-hexane, 検出器 UV 230 nm) で行い、検量線を得た。Rugosic acid A (2) (12.4 mg/エタノール 100 ml; 内部標準 cinnamic acid) 定量は逆相 HPLC (Inertsil ODS, 30% H₂O/CH₃CN 含 0.05% HCl, UV 220 nm) で行った。

3. 分析試料の前処理および定量

葉の酢酸エチル抽出物はメタノール抽出物に比べ比較的各種高極性フェノール成分の混入が少なかったが、分析精度を上げるために、それぞれの分析法に対応した前処理を行った。まず、濃縮後酢酸エチル溶液として密封冷凍保存しておいたサンプルを同溶媒で正確に 25 ml に希釈し、これから 1 ml を取り、これをあらかじめヘキサンに膨潤させた前処理用シリカゲルカラム (SEP-PAK VAC 3 cc, Waters) に通し、さらにカラムを 5 倍量のジエチルエーテルで洗浄した。この通過液および溶出液に内部標準液 1 ml を加えたのち溶媒を除去し、0.5 ml の酢酸エチルに再溶解して GC 分析に供した。カラムを通して化合物のロスのないことは、標準液を使って確認した。

Rugosal A (1) 分析のためのサンプル処理は 3 と同様に上記の前処理用シリカゲルカラムで行い、溶出溶媒には 30% 2-プロパノール/*n*-ヘキサンを用いた。内部標準を加えた通過液および溶出液は、乾固後 1 ml の 20% 2-プロパノール/*n*-ヘキサンに溶解して分析試料とした。Rugosic acid A (2) の分析では夾雑物の影響を避けるために、抽出液 1 ml を濃縮し、約 100 μ l のメタノールに再溶解した。これをクロロフォルム/メタノール=4:1 で TLC にかけて、2 に対応するバンド (R_f 0.6~0.8) を掻き取った。得たシリカ粉末は直ちにメタノールで繰り返し注意深く洗い (総量 25 ml)、マイクロフィルターを通して混入シリカ末を除去し、2 を含む溶出液を得た。これを内部標準とともに乾固し、アセトニトリル溶液として分析に供した。

1: R=CHO rugosal A
2: R=COOH rugosic acid A

3: carota-1,4-dienaldehyde

Fig.1. Structures of the Three Major Carotane Sesquiterpenes of *R. rugosa* Leaves.

定量は1サンプルにつき2反復で行った。各化合物の定量分析における平均誤差は、1, 2 および 3 につきそれぞれ $\pm 1.0\%$, 1.4% および 0.9% に収まる。しかしながら、ハマナス自体が野外で育成している低木であるため、採集時あるいは生育期間の天候、気象状況、日照条件および採集葉の萌芽時期のずれ等、試料の均一化を困難にする要因も少なくなく、今回の定量値はあくまでもハマナス植物集団における主要なセスキテルペン類の概括的な変動結果と見るべきであると考ええる。

4. 切離ハマナス葉片中の化合物 1~3 の量的変化

ランダムに採集したハマナス複葉（7月中旬）から葉片を切り離し、正確に 3.00 ± 0.005 g を秤り、これを水上に浮かべて明所 25°C でそれぞれ 0, 3, 8, 20, 46 および 70 hr インキュベートした。一定時間後、葉片を回収し 50% メタノール/酢酸エチル（50 ml）で4日間抽出した。抽出液は 10 ml に濃縮し、前処理として TLC（クロロフォルム/メタノール 4:1）にかけ、化合物 1 と 2 を含むバンドを上記の方法に従いそれぞれ分取して分析試料とした。化合物 3 の分析には、一度乾固させた粗抽出液を酢酸エチルで再溶解させ可溶部分を前処理用カラムにかけたものを用いた。

5. 健全葉に内在する化合物 1 および 2 の含量に対する被傷害葉からの遊離量の相対比の測定

本実験は化合物 3 の存在が明らかになる以前に行ったもので（1988 年中）、傷害葉および健全葉における 1 および 2 の量的変動を追跡したものである。ここでは、UV 定量を用いてハマナス被傷害葉から遊離される化合物 1 が、健全葉に含まれるそれに対してどの程度の割合であるかを長期的に追跡した。定量対象の 1 および 2 は TLC で精製後 UV 吸光係数からその含有量を算出することとし、検量線を作成したところよい直線性を示した。本定量は比較的大きなスケールで行い（葉重、200~300 g, 2 週間おきに採集）、葉全体を分析試料とした。傷害処理区は木槌でまんべんなく叩き、100 g 当り 800 ml の蒸留水へ 24 hr 浸漬した。水層を回収し、これを等量の酢酸エチルで抽出した。有機層は 5% NaHCO_3 溶液で洗浄し、中性フェノール性と酸性部に分けた。両画分は各々 5 ml に濃縮し、ここからそれぞれ 20 μl を取り、シリカゲル TLC（ベンゼン/酢酸エチル 5:1）にかけた。化合物 1 に対応するスポット（ R_f 0.70）を試験管に掻き取り、5 ml の MeOH を加え攪拌後、静置した。溶液はマイクロフィルターでろ過し、UV 波長

228 nm における吸光度で計測した。分光光度計用のリファレンスとして薄層プレート上のサンプルをチャージしていない部分で同一 R_f に相当するシリカゲルを同様に処理して得た MeOH 液を用いた。一方、対照葉は採集後、直ちにメタノール（100 g/800 ml）へ浸漬し、2 日間抽出した。得られた抽出液はメタノール除去後、酢酸エチルに転溶し、これを 5% NaHCO_3 で洗浄して得た中性フェノール性を濃縮した。これは多くの夾雑物を含むので n -ヘキサン/酢酸エチル 3:1 で 1 に対応するスポット（ R_f 0.5）を分取し、これを再度ベンゼン/酢酸エチル=5:1 で単一の 1 を得、これを同様に UV 吸収の計測に供した。供試溶液が検量線範囲内に収まらない場合は、その都度希釈した。

酸性画分から調製した化合物 2 は、1 と同様に定量した。酸性部の TLC 展開溶媒には n -ヘキサン/酢酸エチル/蟻酸=50:50:1 を用い（ R_f 0.5）、多重展開によって独立した 2 のバンドを得、成分を溶出した。しかしながら定量波長（218 nm）が末端吸収に近いため、特に健全葉中の 2 の定量値には誤差が大きいの部分があるかもしれない。本報告では化合物 1 および 2 それぞれの遊離量/内在量を示す。

結果および考察

カロタンセスキテルペン類を長期にわたって定量した結果、Fig. 2 に示すように各成分の季節的な量的変動が明らかにされた。エンドパーオキシド 1 および 2 の前駆体である *carota*-1,4-dienaldehyde (3) は萌芽期（5 月中~下旬）から開花期（6 月中旬~7 月中旬）にかけてその含有量が高く、萌芽から開花までの 1 カ月間においては直線的な増加傾向が認められた。最大量は 0.8 mmol/kg 新鮮葉（174 mg/kg）におよんだ。しかし、結実期（7 月下旬~8 月下旬）にはその含有量は極度に低下し、落葉期（9 月中旬~10 月中旬）には全く検出されなかった。これに対して、3 種類のカロタンセスキテルペンの中で開花期において最大成分として葉中に含まれる *rugosol* A (1) は 3 の増加を追うように増加し、開花期に前後するかなり長期間にわたり高濃度で保持され、その量は *in vitro* におけるいくつかの植物病原菌に対する最低増殖阻止濃度（*Pyricularia oryzae* に対する MIC, 6.3 $\mu\text{g/ml}$, 溶液法 PS 培地）に十分なレベルに達していた（最高 500 mg/kg 新鮮葉）。本化合物は結実期中期から目立って減少し始め、落葉期にはほとんど含まれな

Fig. 2. Seasonal Changes of the Carotane Sesquiterpenes. The results indicate the conversion from 3 into 2 via 1.

った。

萌芽期に低濃度で抑えられている rugosic acid A (2) は開花期以後増加傾向にあり、化合物 1 の減少後も落葉期前期までは比較的高濃度で維持されていた。結実期から落葉期にかけての葉から、本化合物の代謝産物と見られる、パーオキシド変換を受けたいくつかのカロタンセスキテルペン類が単離されている⁽⁴⁾。以上の結果から、ハマナス葉中で 2 が 3 から 1 を経て生成し、最終的にパーオキシドの変換に始まる代謝を受けて消失してゆく流れのあることが示唆された。

化合物 3 が 1 あるいは 2 の前駆体である以上、その検出がほとんど認められない結実期中期以降はもとより、それら全体の含有量が最大となる 7 月上旬以降、化合物 3 の生成は漸減ないしはほとんど停止してしまうと考えられる。7 月以降も 3 から 1 への変動および 2 の代謝分解は進行し続ける（あるいはより加速される）ため、Fig. 2 に示すような 1 および 2 の減少が認められるのであろう。

実験 4 の結果 (Fig. 3)、切断葉片組織において化合物 3 の 1 あるいは 2 への変換が加速的に起こっていることが示された。この変換反応は一種の過酸化反応であり、また、先の長期的定量結果からこれが葉の老化に伴って進行していることが推察されたことを考え合わせると、切断葉では葉組織の老化と同様の過程が急激に起こっていることが示唆された。恐らく、葉片を主葉脈から切り離した時点で葉組織は大きなストレスを受けているのであろう⁽⁵⁾。Fig. 3 から、切断葉においては 3 の 1 への変換が切断から 46 hr 内では非常に活発に起こる一方、46 hr から 70 hr では 1 から 2 への酸化が加速されてい

Fig. 3. Short Time Changes of the Carotane Sesquiterpenes in the Detached Leaflets of *R. rugosa*. The total molar concentration of these three carotane sesquiterpenes in each treatment showed an average of $2.42 (\pm 0.42)$ mmol/f. w. A broken line (.....) and a non-relief mark of coordinate indicate the calculated amount of each compound, while a solid line (—) and a shaded mark show their content ratio of total molar concentration in each sample. The symbols (Δ), ($\circ$) and ($\square$) express compounds 1, 2 and 3, respectively.

ることが読取れる。それぞれの含有量をモル絶対値から (Fig. 3 の破線) 3 成分の合計モル量の平均値に対する各成分の割合 (%) に代えて表示してみると (Fig. 3 の実線)、曲線はより鮮明にその傾向、特に化合物 2 の相対的な増加を示すようになる (Fig. 3 の縦軸には各処理区の成分量をミリモルで左側に、各分析時の 3 成分合

Fig. 4. Percentage of Diffused Amount of Rugosal A (1) and Rugosic Acid A (2) from the Wounded Leaves. After the wounded leaves were soaked in water for 24 hr, the amounts of 1 and 2 which diffused out from the wounded leaves into water were measured. The percentage of these diffused compounds to those retained in the leaves were then calculated as shown in the figure. The results indicated that the percentage of diffused compounds was more dependent on the amount of carota-1,4-dienaldehyde (3) than those of compounds (1, 2) retained in the leaves (see Fig. 2).
 ■ : rugosic acid A, ● : rugosal A.

計量の平均値, 2.42 を 100% とした成分比を右側に取った). 上記の葉片切離ストレスによるカロテン類の変動結果は, 非常に強い酸化的条件下に置かれる被傷害葉組織において化合物 3 の過酸化がより急激に進行する可能性を示唆していた。

機械的傷害を与えたハマナス葉 (1.3 kg, 7月上旬採集) を水浸漬 (24 hr) すると, 得られた水層には約 3.0 g の酢酸エチル可溶成分が浸出しており, このうち中性フェノール性成分は 0.8 g を占めた。後者のなかに rugosal A (1) はおよそ 15% 含まれていた⁽²⁾。化合物 1 は, 純品では難水溶性であるにもかかわらず, 浸出物の中で相対的に大きい成分として水層に遊離していた。この, 被傷害部における化合物 1 の比較的选择性の高い遊離について知見を得るため, 実験の部 5 で行った定量結果を解析した。

いくらかのばらつきは含むものの, 本実験結果は健全葉中の内在性 1 量に対する傷害葉からの遊離 1 量の比が萌芽期では高く, 萌芽初期あるいは結実期では低くなる傾向を明確に示していた (Fig. 4)。得られた定量値は化合物 1 の被傷害部からの遊離量が内在性の 1 の含量には

ほとんど依存せず, 一方で 1 の前駆体である化合物 3 の含有量との間に良好な相関があることを示していた。つまり, 葉中の 3 の含有量が高い時期 (萌芽期～開花期) には被傷害部からの 1 の遊離量 (比) が高く, 3 が比較的僅かしか含まれない萌芽期初期および結実期には 1 の遊離量 (比) も低くなる傾向が見出された。実験 4 で明らかにした切離葉片における 3 の 1 への過酸化反応の昂進と併せ, 本結果は, 被傷害部から遊離される化合物 1 が内在性のものに由来するよりもむしろ化合物 3 の急激な過酸化によって生成したものである可能性を示している。同様に, 化合物 2 の被傷害葉からの遊離比 (Fig. 4) は化合物 3 から 1 の生成, および引続いて 1 から 2 への酸化生成を示唆した。この推察を踏まえて, 被傷害部からの 1 の選択的な遊離は, 基質となる化合物 3 が過酸化を受けた時点で外界 (水相) への分散を起こしやすい状況にあると考えられる。

化合物 3 は, 細胞分画において 1 あるいは 2 に比べクロロプラストと挙動をともにするものの量が際立って多かったため, 3 のほとんどがクロロプラストに局在するものと考えていた⁽⁶⁾。ところが最近になって, 化合物 1,

2, 3 を含むセスキテルペン類のほとんどすべてがハマナス葉の裏面にある腺毛から分泌される粘性の高い無色の液滴に含まれることが明らかになった⁽⁷⁾。そこで、この分泌物をエタノールで洗浄し、葉自体にダメージが及ばないように更に水洗した葉について再度、細胞分画を行ったところ、クロロプラスト画分には有意な量の 3 を検出することができず、クロロプラストに 3 が局在する可能性は否定された。しかしながら、傷害処理によって分散した腺毛分泌物のうち特に極性の低い 3 は、被傷害組織の細胞膜あるいはクロロプラスト膜を構成する脂質と容易に会合すると思われる。その部位で 3 が過酸化を受け、1 となって膜との親和性を消失する、あるいは膜自体が崩壊してゆくために外界（水相）へ離散する結果、化合物 1 の高選択的遊離が観察されるのかもしれない。ここで論じた被傷害葉における 1 生成および遊離過程は、現在のところ推定に過ぎない。しかしながら、ハマナス葉におけるカロタンセスキテルペン類の生成部位⁽⁷⁾、あるいは 3 の過酸化機構等⁽⁸⁾が明らかになるにつれて、本化合物群の挙動およびその生理的役割を説明することが可能になってゆくであろう。ハマナス葉では、被傷害組織がすみやかに褐変を呈し、その変色域は葉脈に沿って徐々に広がってゆく。それに伴い、葉脈上にのみ分布している先の腺毛が⁽⁷⁾、球状の先端部に著しい褐変を起し始める。この観察は、腺毛先端の球状多細胞組織が葉脈あるいは柔組織と密に連絡していることを示していると考えられよう。これらの結果を踏まえ、今後、ハマナス葉中におけるカロタノイドの動態研究では、細胞や組織レベルでの傷害認識あるいは生理的な変化をも包括した展開を図っていく必要があると考えられる。

要 約

ハマナス (*Rosa rugosa*) 葉の主要内在性カロタンセスキテルペン、carota-1, 4-dienaldehyde (3), rugosal A (1) および rugosic acid A (2) の量的変動を萌芽から落葉にまでわたって追跡し、また、傷害を含めたストレス条件下にある葉中の化合物 1~3 の短期的変動を

調べた。内在性成分として葉に含まれる化合物 3 は萌芽期から開花期にかけて増加し続け、開花期が終ると急激に減少した。化合物 1 は 3 を追うように増加し、開花期から結実期にかけての長期間、抗菌活性発現に十分な濃度の 1 が保持された。化合物 2 は萌芽期には少なく、成熟葉あるいは初期老化葉では最大成分として蓄積し、葉の黄化および落葉期に至って消滅した。これらの定量結果は、ハマナス葉組織における化合物 3 から 1 を経た 2 への酸化経路 (3→1→2) を示唆しており、また、葉の老化に伴う組織内の代謝産物の酸化昂進を示すものと考えられた。特に傷害等のストレス下にある葉ではその酸化が著しく増進されるため、ストレス条件下におけるハマナス葉組織の酸化的状態への遷移を示すものとして注目された。さらに、化合物 3 の 1 への酸化から見た、水浸漬した被傷害葉からの化合物 1 の選択的遊離過程を考察した。

植物における過酸化反応に関して御助言を頂いた北海道大学低温科学研究所教授、匂坂勝之助先生に深謝します。

- (1) N. E. Mashchenko, P. K. Kintya, S. N. Semina, N. N. Balashova and S. A. Shvets: F. E. C. S. Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod., [Proc], 3rd 1985 (Pub. 1987). *Chem. Abstr.*, **109**, 187501 (1988).
- (2) Y. Hashidoko, S. Tahara and J. Mizutani: *Phytochemistry*, **28**, 425 (1989).
- (3) Y. Hashidoko, S. Tahara and J. Mizutani: *Phytochemistry*, **29**, 867 (1990).
- (4) Y. Hashidoko, S. Tahara and J. Mizutani: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1049 (1991).
- (5) M. Kar and J. Feierabend: *Planta*, **160**, 385 (1984).
- (6) 橋床泰之, 田原哲士, 水谷純也: 第 33 回天然物有機化学討論会講演要旨集, 1990, p. 6, 千葉.
- (7) Y. Hashidoko, S. Tahara and J. Mizutani: *Phytochemistry*, submitted.
- (8) Y. Hashidoko, S. Tahara and J. Mizutani: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1991**, 211.