

オニグルミの抽出物がニセアカシアの発芽に及ぼす影響

鄭矩¹・吉崎真司¹・高砂子昌久²・蛭原絹子²・今澤菜保子¹Effect of Walnut (*Juglans ailanthifolia* Carr.) Extracts on the Germination of Locust (*Lobinia pseudo-acacia*) SeedKoo Jung¹, Shinji Yoshizaki¹, Masahisa Takasago², Kinuko Niihara², Naoko Imazawa¹

Abstract: Locust (*Lobinia pseudo-acacia*) possesses salient features such as strong competitiveness, great fertility and allelopathy. Therefore, a considerable change of ecosystem has been caused in some riparian and coastal forests of Japan and Korea. Although some methods for control their fertility by logging and chemical treatments are currently being tried, good results has not been produced yet. It is desired that new and alternative measures which will take the place of present methods. This study is focused on component of Juglone, which is known as the substances cause allelopathy. As the results of experiments, it was cleared that Supercritical CO₂ Fluid Extraction was better than water extract method on Juglone and the extract from both method showed the negative effects on germination and initial growth of locust. Further study would be necessary on seasonal change of components, effect of root on germination etc.

1 はじめに

北アメリカ原産の先駆性樹木であるニセアカシア (*Lobinia pseudo-acacia*) は、日本では明治時代に導入され、韓国では1960年代後半から荒廃地の緑化目的で植栽されてきた。日本と韓国ではその旺盛な繁殖力や他感作用によって他の植物の成長を阻害し、生態系の変化を引き起こしている⁶⁾。

海岸や河川におけるニセアカシアの群落は増加傾向にある⁵⁾⁷⁾。ニセアカシアの駆除対策として、1990年代から国土交通省、環境省、林野庁などで、移入種問題に関する意識調査、移入種問題の事例収集、移入種取扱ガイドラインの策定、外来種の生態や侵入経路などの移入種対策への取り組みが行われている。従来のニセアカシアの制御方法としては伐採と化学薬剤処理が行われてきた⁹⁾。しかし、化学薬剤処理方法は化学薬剤の毒性や土壌残留による環境問題を起こしている⁴⁾。そのため、化学薬剤によらない生態的制御方法の構築が必要である。

クルミ科樹木のアレロパシーに関する研究は1920年代から報告されている。Davis (1928)¹⁾はクログルミ (*Juglans nigra*) の根や果実の殻に有毒物質が含まれていること、Fisher (1978)³⁾は土壌の水分条件がクログルミと他植物の相互関係に重要な役割を果たしていることを報告している。また、アメリカでは他感作用物質として知られるユグロン (Juglone) を含むクログルミがニセアカシアの生育に影響を及ぼすことが知られている²⁾¹⁰⁾。日本に自生するオニグルミ (*Juglans ailanthifolia* Carr.) もユグロンを含んでいることが知られているが、オニグルミに含まれるユグロンがニセアカシアに及ぼす影響については明らかにされていない。そこで、本研究では他感作用物質とされるユ

グロンを含む、在来種のオニグルミを用いたニセアカシアの生長制御方法を明らかにすることを目的とした。

本稿ではオニグルミの各部位から水抽出法と超臨界二酸化炭素抽出法を用いた阻害物質の抽出結果、抽出された物質を用いた発芽実験の結果について報告する。

2 抽出法の概要

含有物質の抽出には、水抽出法と超臨界二酸化炭素抽出法を用いた。

水抽出法は自然界で起こっている現象を真似る意味では優れている。通常、試料を水に浸漬することによって抽出する。水抽出法では、水に溶けやすい多種多様な物質が抽出され、選択性は期待できない。

一方、超臨界二酸化炭素の溶解度はヘキサンと同程度といわれているが、圧力や温度のコントロールにより溶解度を変化させたり、条件によっては特定物質の選択的抽出も可能となる。その利用は1980年頃から始まり、近年では医薬品、食品、香料の分野を中心に実用化が進んできている。超臨界流体とは、液体と気体との区別がつかなくなる臨界点以上に加熱・加圧された状態のことであり、二酸化炭素の場合は、温度31.0°C、圧力72.9atmと比較的緩和な条件で超臨界流体となるため、様々な分野で応用されている。利点は、溶媒との反応が起こらないこと、低温域での抽出のため、温度変性の可能性が低いこと、抽出物の回収が容易であること、などがあげられる。

3 実験方法

3.1 水抽出法を用いたオニグルミからの他感作用物質の抽出

オニグルミは2003年9月に静岡県庵原郡由比町阿層付近で採集したものを、葉、殻、偽果、枯葉に分けて、それぞれ細かく切って使用した。各部位をガラス容器に入れ、それぞれに適量の蒸留水を加えて、重石を置き一晚静置した。その後、ろ紙 (No. 3) を用いて吸引ろ過し、そのろ液を抽出液とした。生葉は60gに蒸留水を

¹武蔵工業大学環境情報学部, Faculty of Environmental and Information Studies, Musashi Institute of Technology, 3-3-1 Ushikubo-nishi Tsuzuki-ku, Yokohama, Kanagawa Prefecture, 224-0015 Japan.

²武蔵工業大学工学部, Faculty of Engineering, Musashi Institute of Technology, 1-28-1 Tamatsutsumi, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8557 Japan.

加えて300gとして、これを20%溶液とした。同様に殻は30%溶液を、偽果は10%溶液をつくり、それぞれ発芽実験に用いた。

3.2 超臨界二酸化炭素抽出法を用いたオニグルミからのニセアカシア他感作用物質の抽出

2005年8月に静岡県富士川河口右岸部で採集したオニグルミについて、ニセアカシアの他感作用物質の超臨界二酸化炭素抽出を行った。超臨界二酸化炭素抽出装置は日本分光製を使用した。抽出装置の概略図は図2の通りである。実験では、オニグルミを各部位(葉, 殻, 枝, 根, 偽果, 葉柄)に分け、粉碎後、1.5gを用いた。抽出条件は次の通りである。圧力は100, 200, 300kg/cm²の3つ条件で行い、いずれも温度50℃, 抽出時間は1800sとした。

3.3 水抽出法による抽出液を用いた発芽実験

本実験では、オニグルミがニセアカシアに対して他感作用があるのか、またあるとすればどの部位が影響を与えるのかについて検討した。本法ではオニグルミの各部位の抽出液を用いて、ニセアカシアの発芽に対する影響を調べた。発芽阻害の標準物質として、東京化成工業製のユグロン(5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone)及びその誘導体、2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone(以後Hydroxy誘導体という)、2-Methyl-1,4-naphthoquinone(以後Methyl誘導体という)を用いた。また、コントロールには蒸留水を用いた。

発芽実験に使用した各溶液は水で希釈して使用した。生葉からの抽出液は水で希釈して5%, 10%, 15%, 20%の濃度に調製した。枯葉は、5%, 10%, 15%, 20%濃度、殻は10%, 20%, 30%濃度、偽果は10%濃度に調製した。枯葉は蒸留水、5%溶液、10%溶液、15%溶液、20%溶液とした。

実験器具および装置は雑菌が入らないよう滅菌処理と乾熱滅菌処理をして使用した。ニセアカシア種子は、濃硫酸に10分間浸漬した後、蒸留水で3回洗浄して用いた。その後、70%エタノールに2分間、次亜塩素酸ナトリウム水溶液に10分間浸した後、蒸留水で3回洗浄した。発芽実験はシャーレ中で行った。

シャーレにニセアカシア種子を20粒、抽出溶液を10ml入れ、グロスチャンパー内に静置した。チャンパーの設定は35℃の明条件と30℃の暗条件で12時間サイクルを10日間行い、実験終了時に発芽数、根長、莖長を測定した。発芽実験は3回行い、その平均値をデータとして採用した。

さらに標準品との比較のため、次の実験を行った。蒸留水、葉の抽出物(0.26%v/v)、ユグロンおよび誘導体であるMethyl誘導体、Hydroxy誘導体について、それぞれ0.5mMおよび1.0mMの濃度で6日間発芽実験を試みた。チャンパーの設定は上記と同様である。実験終了時に幼根長を測定して、オニグルミの抽出物との阻害作用を比較検討した。

3.4 超臨界二酸化炭素抽出法による抽出物を用いた発芽実験

実験器具および装置の滅菌処理と乾熱滅菌処理および種子の滅菌処理は水抽出溶液を用いる発芽実験と同様に行った。

シャーレにニセアカシア種子を20粒、抽出溶液

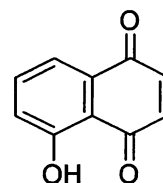


図1:ユグロン(C₁₀H₆O₃=174.16)

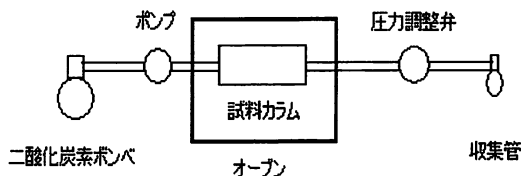


図2:超臨界二酸化炭素抽出システム概略図

を10ml入れ、グロスチャンパー内に静置した。試料は蒸留水と葉の抽出物(0.26%(v/v))さらにユグロン、Methyl誘導体、Hydroxy誘導体をそれぞれ0.5mMと1.0mMの濃度にして、発芽実験を行った。チャンパーの設定は35℃の明条件と30℃の暗条件で12時間サイクルを6日間行い、実験開始から毎日、発芽数を測定し、平均値を算出した。また、実験終了時に幼根長を測定した。なお、発芽実験は3回行い、その平均値をデータとして採用した。

3.5 抽出物の中のニセアカシア他感作用物質の確認
水抽出物および超臨界二酸化炭素抽出物中の他感作用物質として知られているユグロンの存在を確認するために、薄層クロマトグラフィ(TLC:Thin Layer Chromatography)を行い、さらに詳細な情報を得るためにガスクロマトグラフ質量分析を行った。発芽阻害の標準物質としてユグロンを用いた。

本実験のTLCの条件は次のとおりである。

薄層板はSilica Gel(ANAL TECH製)を使用し、超臨界抽出物の展開溶媒にはヘキサン:酢酸エチル:クロロホルム(4:1:1)を使用し、水抽出物の展開溶媒には酢酸エチル:1-プロパノール:蒸留水(6:4:3)を使用した。約15cm展開後、発色剤[1%Ce(SO₄)₂/10%H₂SO₄]を噴霧し、90℃のオーブンで約10分間加熱した。実験は葉、殻、枝、根、偽果、葉柄の超臨界抽出物および超臨界抽出物でユグロンが確認された根の水抽出物について行った。

本実験のガスクロマトグラフ質量分析の分析条件は次のとおりである。装置はGCMS-PQ2010(島津製作所製)を用いた。分析条件は次のとおりである。カラムはDB-5MS(30m×0.25mm, 膜厚:0.25μm)を使用し、カラム温度は50℃で1分間保持した後、30℃/1minで260℃まで昇温させ、分析時間は12分とした。マススペクトルのインターフェース温度は250℃, イオン化電圧70ev, 選択質量はEI=m/z・60~350である。抽出物はアセトン5mlで希釈し、分析試料とした。マススペクトルのライブラリーはNIST(National Institute of

Standards and Technology) を用いた。実験は根および葉の超臨界抽出物について行った。

4 結果および考察

4.1 水抽出法を用いた他感作用物質の抽出

水抽出法を用いてオニグルミ各部位から茶色の抽出液を得ることができた。各々の10%抽出液のpH及びEC(mS/cm)を比較したところ、生葉で6.09, 1.74, 枯葉で5.96, 2.81, 殻で7.63, 0.175, 偽果で8.98, 3.39を示した。pHとECでは偽果で最も高い値を示した(図3, 4)。

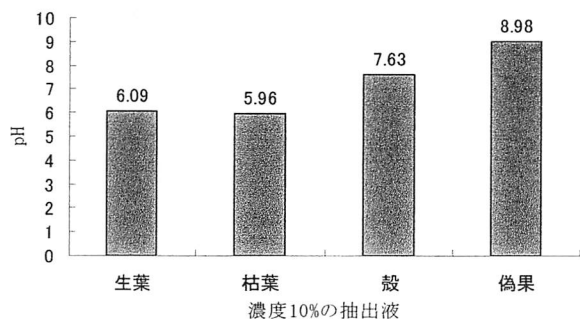


図3: オニグルミの各部位別10%濃度のpH

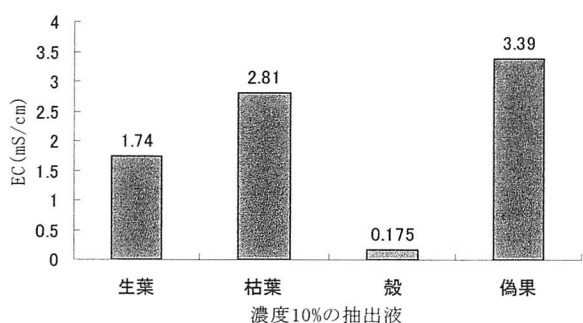


図4: オニグルミの各部位別10%濃度のEC

4.2 水抽出液を用いた発芽実験

オニグルミの生葉と枯葉から抽出した溶液では、溶液濃度が高くなるにつれてニセアカシアの発芽率は低下し、濃度20%で発芽率は26.7%, 50.0%となった(図5)。また、殻と偽果の抽出液では同じ傾向を示し、殻の20%抽出液と偽果の10%抽出液では各々66.7%, 43.3%であった(図6)。このことから、生葉のほうが発芽抑制効果は大きいと考えられた。

一方、抽出液は茎長や根長にも成長抑制効果を示した(図7, 8)。特に、図8に示すように生葉抽出液の抑制効果は大きく、濃度20%では蒸留水の根長で4.5cm, 茎長で6.35cmに比べて、根長で0.71cm, 茎長で0.41cmの値を示し、殻の場合の根長で3.24cm, 茎長で5.78cmと比べても影響が顕著であった。

4.3 超臨界二酸化炭素抽出法を用いた他感作用物質の抽出

圧力は200kg/cm³, 温度50℃, 抽出時間は1800秒で試料1.5gから超臨界抽出したところ、葉: 0.0083g, 葉柄: 0.0080g, 枝: 0.0155g, 殻: 0.0024g, 根: 0.0060g,

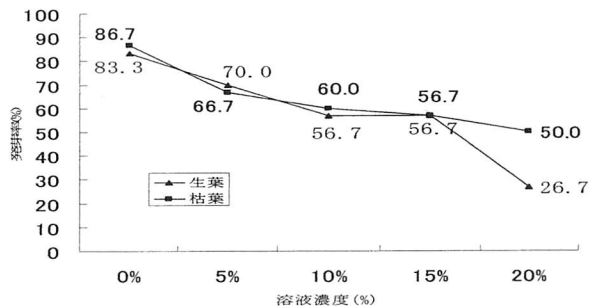


図5: オニグルミの生葉抽出液と枯葉抽出液がニセアカシアの発芽率に及ぼす影響

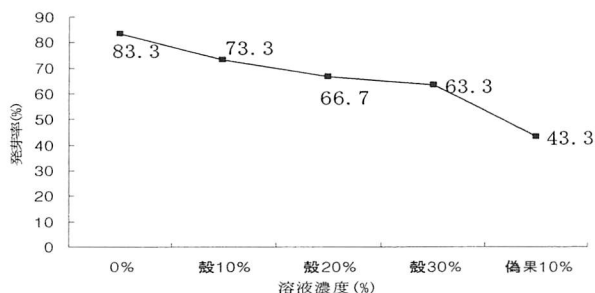


図6: オニグルミの殻, 偽果の抽出液がニセアカシアの発芽率に及ぼす影響

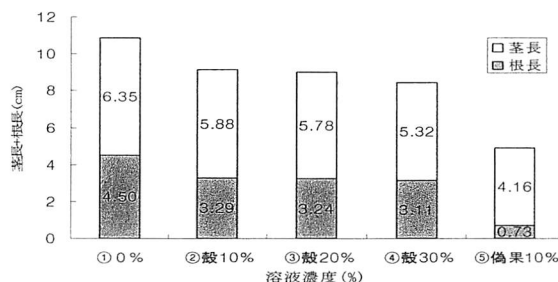


図7: オニグルミ殻・偽果の抽出液がニセアカシアの初期生育に及ぼす影響

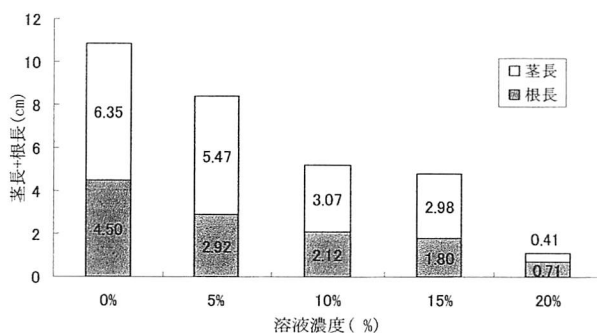


図8: オニグルミ生葉抽出液がニセアカシアの初期生育に及ぼす影響

偽果: 0.0086gの淡黄色の抽出物が得られた。根および葉からの抽出物のTLCにより、根で4つ, 葉で6つの淡黄色のスポットが確認できた。標準物質と試料の薄層クロマトグラフを写真1に示した(スポット

が不鮮明のため、丸で囲ってある)。ユグロンはRf値0.807に鮮明な黄色を呈した。根にはユグロンと同じRf値0.807のスポットが鮮明に認められた。このことから、根にはユグロンが含まれていると考えられる。葉にはRf値0.807のスポットが弱く観察されたことから、その量はわずかであると思われる。また、根や葉にはユグロン以外にも複数のスポットが確認された。

ユグロンおよび根と葉の超臨界抽出物についてGC-MSを用いて分離、分析した結果の全イオンクロマトグラム(TIC)を図11に示した。ユグロンでは保持時間6.75minにピークが観察された。根にもユグロンと同じ保持時間に大きなピークが検出され、そのピークのマスペクトル(図12)はユグロンのマスペクトルと一致した。以上の結果から、オニグルミの根にはユグロンが含まれていることが確認できた。また、葉のTICにも保持時間6.75minに小さなピークが観察されたことから、少量のユグロンが含まれていることが確認された。根や葉に観察された他のピークにはユグロンの誘導体が含まれている可能性があると思われるが、まだ同定に至っていない。また、葉には根に比べ数多くのピークが確認されたが、データベースにより脂肪酸である可能性の高い物質が複数確認された。TLC, GC-MSの結果から、超臨界二酸化炭素抽出法はオニグルミから他感作用物質であるユグロンを簡便かつ迅速に抽出できることがわかった。

また、根の水抽出物のTLCの結果からは、複数のスポットが確認されたが、ユグロンのRf値と一致するスポットはなく、水抽出物にはユグロンが含まれていないことがわかった。ユグロンは水に溶けにくい物質であり、水抽出法ではユグロンは抽出されにくいと考えられる。しかし、水抽出物にも発芽抑制が観察されていることから、この場合はユグロン単体ではなく、その誘導体や配糖体などの影響で発芽抑制効果が発現したのではないかと考えられる。

4.4 超臨界二酸化炭素抽出物を用いた発芽実験

オニグルミを用いて、ニセアカシアの発芽抑制ができるかどうかを確認するために、ニセアカシア種子に対して発芽実験を行った。

6日経過後の発芽率(図9)は、0.5mMのユグロンで68.3%、1.0mMユグロンで53.3%、0.5mMのHydroxy誘導体で45.0%、1.0mMのHydroxy誘導体で28.3%、0.5mMのMethyl誘導体で8.3%、1.0mMのMethyl誘導体で0%であった。つまり、各溶液は濃度が高いほど発芽率は低下した。

一方、葉抽出物の発芽率は71.6%で発芽抑制効果は小さかったが、平均幼根長で15.6mmを示し、ユグロンの24.3mmより成長抑制効果がみられた。更に、ユグロン単体に比べてHydroxy誘導体、Methyl誘導体の方が発芽率に影響を及ぼすことが確認できた(図9, 10)。

今後は、TLCとTICにより、ユグロンを含むことが確認できた根を用いた発芽実験を行うことで、抽出物の抑制効果が更に明らかになると考えられる。また、ユグロン単体に比べてHydroxy誘導体、Methyl誘導体のほうが発芽と幼根成長を抑制した。このことからユグロンだけではなく、複数の物質も発芽と幼根成長に関与していると考えられる。

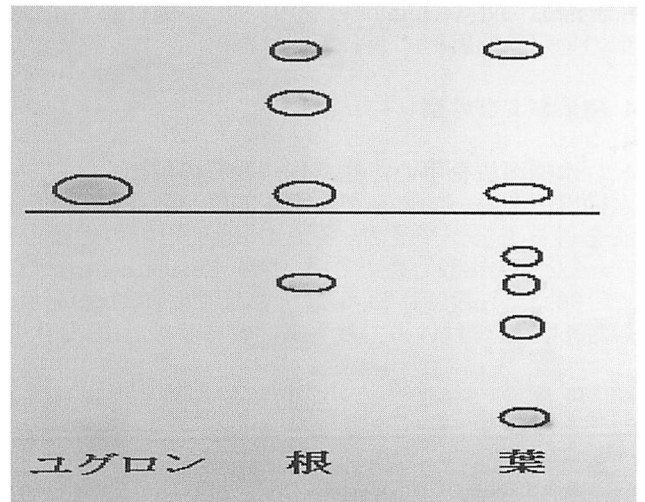
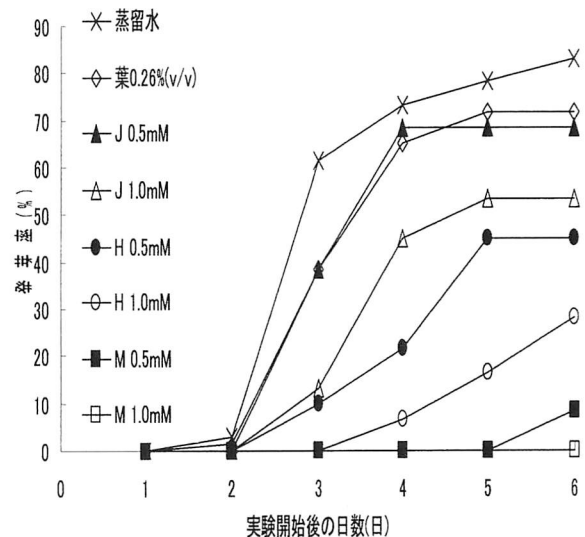


写真1:TLCによるユグロン及び他物質の展開



図中, J : Juglone, H : 2-Hydroxy-1.4-naphthoquinone
M : 2-Methyl-1.4-naphthoquinone

図9 : 溶液別発芽率の推移

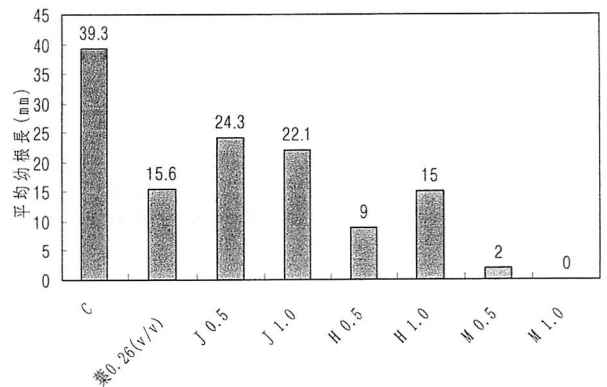
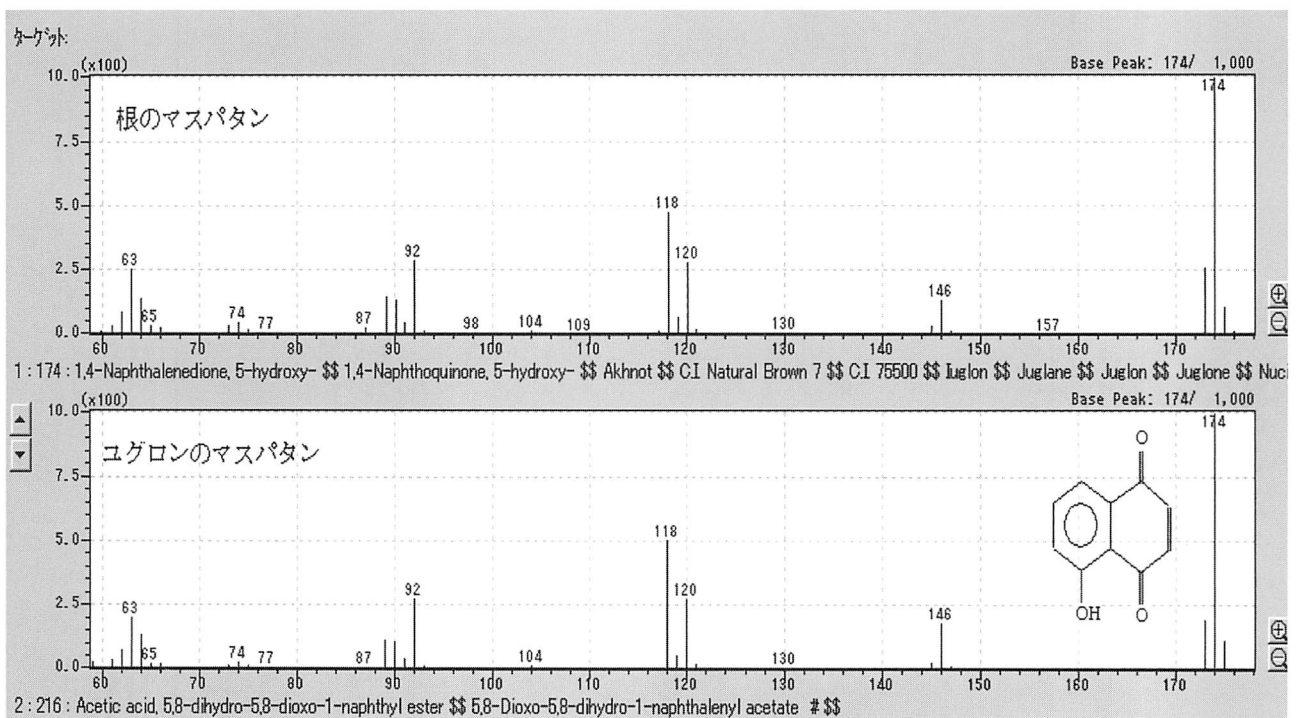


図10 : ニセアカシア種子の幼根生長に及ぼす葉抽出物、ユグロン及び2種類の誘導体の影響



図11:ユグロン, 根, 葉の全イオンクロマトグラム



上段: オニグルミの根の抽出物ピーク1(図11参照)のマススペクトル

下段: ユグロンのマススペクトル

図12: マススペクトル

5 まとめ

本研究では、オニグルミ中からニセアカシアに対する他感作用物質を水抽出法と超臨界二酸化炭素抽出法によって抽出した。オニグルミの各部位(葉, 殻, 枝, 根, 偽果, 葉柄)のうち, 葉および根の超臨界二酸化炭素抽出物中にユグロンが含まれていることが確認できた。超臨界二酸化炭素抽出法は他感作用物質を簡便, 迅速に抽出する方法として有効であった。

水抽出物と超臨界二酸化炭素抽出物を用いた発芽実験ではニセアカシア種子の発芽および幼根生長に対する抑制効果がみられた。

なお, 田中(1999)⁸¹では, ペルシャグルミ (*Juglans regia* L.) は季節によって成分が変わると報告されていることから, オニグルミの各部位, 特に根と葉を季

節別に採取し, 抽出実験を通じて他感作用物質の有無を確認することや, 季節別抽出物を多様な濃度で発芽実験を行う必要もあると思われる。

引用文献

- [1] Davis, E.F.(1928): The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. *Am.J.Bot.* 15, 620.
- [2] Elroy L.Rice (1974): アレロパシー, 学会出版センター, 1-9章. 470pp.
- [3] Fisher, R.F.(1978): Juglone inhibits pine growth under certain moisture regimes. *Soil Sci.Soc.Am.J.* 42, 801-803.
- [4] 藤井義晴 (2000): アレロパシー他感物質の作用と利用, 農文協, 18-30, 154-168.

- [5] 池谷奉文(2001):多摩川河川敷におけるニセアカシアの分布拡大と生育環境に関する調査研究, 東急環境浄化財団. 113pp.
- [6] 小山泰弘(2001):長野林業総合センターミニ技術情報 No32.
- [7] 前河正昭・中越信和(1997):海岸砂地においてニセアカシア林の分布拡大がもたらす成帯構造と種多様性への影響, 日本生態学会誌, 131-143.
- [8] 田中治・永井正博ら(1999):天然物化学, 南江堂, 200-205.
- [9] 竹本俊夫・外山篤司(1995):除草剤によるニセアカシアの駆除, 林業技術, No641.
- [10] Yuka Kobayashi and Misako Ito (1998): Valuation of Phytotoxic Activity of Naturally Occurring Phenolic Compounds, 雑草研究 Vol. 43, 341-348.

[受付 2005年9月20日, 受理2005年12月20日]