

北海道産針葉樹の脂質成分と
樹種特性との関連性に関する化学的研究

2008. 9

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(帯広畜産大学)

佐藤 真由美

目次

I. 緒言	1
II. グイマツ雑種 F ₁ 人工交配家系におけるジテルペンの遺伝特性 並びにそれらによる樹種判別	6
実験方法	7
1. 材料	7
2. DNA マーカーによる苗木の雑種判別	7
3. ジテルペンの分析	10
4. 統計解析	11
実験結果	13
1. DNA マーカーによる雑種判別	13
2. 成木のジテルペン組成	13
3. ジテルペン含有量による成木の樹種判別	18
4. 苗木のジテルペン組成	22
5. ジテルペン含有量による苗木の雑種判別	26
6. ジテルペンタイプの比較	31
考察	36
要約	42
III. グイマツ雑種 F ₁ 人工交配家系における葉の脂肪酸組成の特徴 並びにそれらによる樹種判別	43
実験方法	44

1. 材料	44
2. 全脂質の抽出と分画	45
3. ケイ酸 TLC	45
4. 脂肪酸の分析	46
5. 統計解析	46
実験結果	47
1. 成木の葉の全脂質における脂肪酸組成	47
2. 成木の脂肪酸組成による主成分分析と線形判別分析	50
3. 糖脂質画分と中性リン脂質画分の主要脂質クラスとその脂肪酸組成	54
4. 苗木と成木の葉の全脂質における脂肪酸組成の比較	58
考察	62
要約	66

IV. グイマツ雑種 F₁ 人工交配家系における葉のステロール組成と

カラマツカルスのステロール脂質クラスにおけるメバロン酸

添加の影響	67
実験方法	70
1. 材料	70
2. 細胞培養	70
3. 脂質抽出	71
4. ステロールの分析	71
5. GC 分析	72
6. 統計解析	72

実験結果	73
1. 葉のステロール組成	73
2. カルスの成長における MVA の影響	73
3. ステロール含有量における MVA の影響	77
4. 各脂質クラスのスレオール組成における MVA の影響	80
考察	84
要約	86
V. 総合考察	87
VI. 参考文献	103

略語

ACP : acyl carrier protein

AS : アシルステロール

ASG : アシルステリルグリコシド

BHT : butylated hydroxytoluene

BSA : ウシ血清アルブミン

CDP : copalyl diphosphate

CDP-DG : cytidine-5'-diphosphate-ジアシルグリセロール

CMH : セラミドモノヘキシシド

CTAB 法 : cetyltrimethylammonium bromide 法

CTP : cytidine-5'-triphosphate

DG : ジアシルグリセロール

DGDG : ジガラクトシルジアシルグリセロール

DMADP : dimethylallyl diphosphate

dNTP : deoxyribonucleotide triphosphate

F₁ : *Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.

FDP : farnesyl diphosphate

FS : 遊離ステロール

GC-MS : ガスクロマトグラフ質量分析計

GDP : geranyl diphosphate

GGDP : geranylgeranyl diphosphate

GL : 糖脂質

G3-P : グリセロール 3 リン酸

HPLC.: 高速液体クロマトグラフィー

IDP : isopentenyl diphosphate

LPA : リゾホスファチジン酸

MGDG : モノガラクトシルジアシルグリセロール

MVA : メバロン酸

NMR : 核磁気共鳴

NpABC1 : ATP binding cassette transporter

PA : ホスファチジン酸

PC : ホスファチジルコリン

PCR-RFLP : polymerase chain reaction-restriction fragment length
polymorphism

PE : ホスファチジルエタノールアミン

PG : ホスファチジルグリセロール

PI : ホスファチジルイノシトール

PL : 中性リン脂質

rbcL : the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase

SG : ステリルグルコシド

SQDG : スルフォキノボシルジアシルグリセロール

TAE 緩衝液 : Tris-acetate-EDTA 緩衝液

TIC : total ion chromatogram

TLC : 薄層クロマトグラフィー

12:0 : ラウリン酸

14:0 : ミリスチン酸

16:0 : パルミチン酸

16:1 : パルミトレイン酸

16:3 : ヘキサデカトリエン酸

br-17:0 : 14-メチルパルミチン酸

17:0 : ヘプタデカン酸

18:0 : ステアリン酸

18:1 : オレイン酸

18:2 : リノール酸

18:3 : リノレン酸

20:0 : アラキジン酸

20:3 : イコサトリエン酸

22:0 : ベヘン酸

23:0 : トリコサン酸

24:0 : リグノセリン酸

25:0 : ペンタコサン酸

26:0 : ヘキサコサン酸

28:0 : オクタコサン酸

30:0 : トリアコンタン酸

32:0 : ドトリアコンタン酸

I. 緒言

Larix 属はヨーロッパ・シベリア・ヒマラヤ・北アメリカ北部など北半球の亜寒帯と中緯度の高山に広く分布する落葉針葉樹である¹⁾。日本には、ニホンカラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr., 以下カラマツ) 一種のみが、主に中央高地に分布しているが、日本中部のみならず、東及び北日本においても成長がよい²⁾。そのため、日本の北に位置する北海道において重要な造林樹種となっている。しかしながら、北海道の在来種であるエゾヤチネズミ (*Clethrionomys rufocanus bedfordiae* Thomas) による苗木や樹幹の下部への食害は、深刻な問題であり^{3,4)}、その防除費は年間 2~4 億円に上る (Fig. 1)⁵⁻¹⁴⁾。一方、サハリン及びクリル諸島南部に分布するグイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg.) はカラマツよりも成長速度が劣るものの、耐そ性や材質に優れている。これらの交配家系であるグイマツ雑種 F₁ (*L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr., 以下 F₁) はグイマツの長所である材質¹⁵⁾、耐そ性^{16, 17)}を保持し、成長速度^{18, 19)}の部分ではカラマツよりも優れていることから、北海道における有望な造林樹種と考えられている。特に近年では、地球温暖化防止対策として森林・林業の役割への期待が高まっており、優れた育林種苗が求められている。F₁ に関しては炭素固定能の優れた家系の選抜が行われていることから^{20, 21)}、今後さらに需要が高まると予想される。

F₁ の種子は、母樹であるグイマツと花粉親であるカラマツが混植された採種園において、自然受粉を経てグイマツから採取される。採取された種子には F₁ の種子とともにグイマツの種子が混在しているが、種子の段階でそれらを判別することはできない。現在は、それらの種子を播種後、それら苗木の形態学的特徴 (苗長、枝数) やフェノロジー (冬芽形成期、黄葉期、芽どまり期) の違い

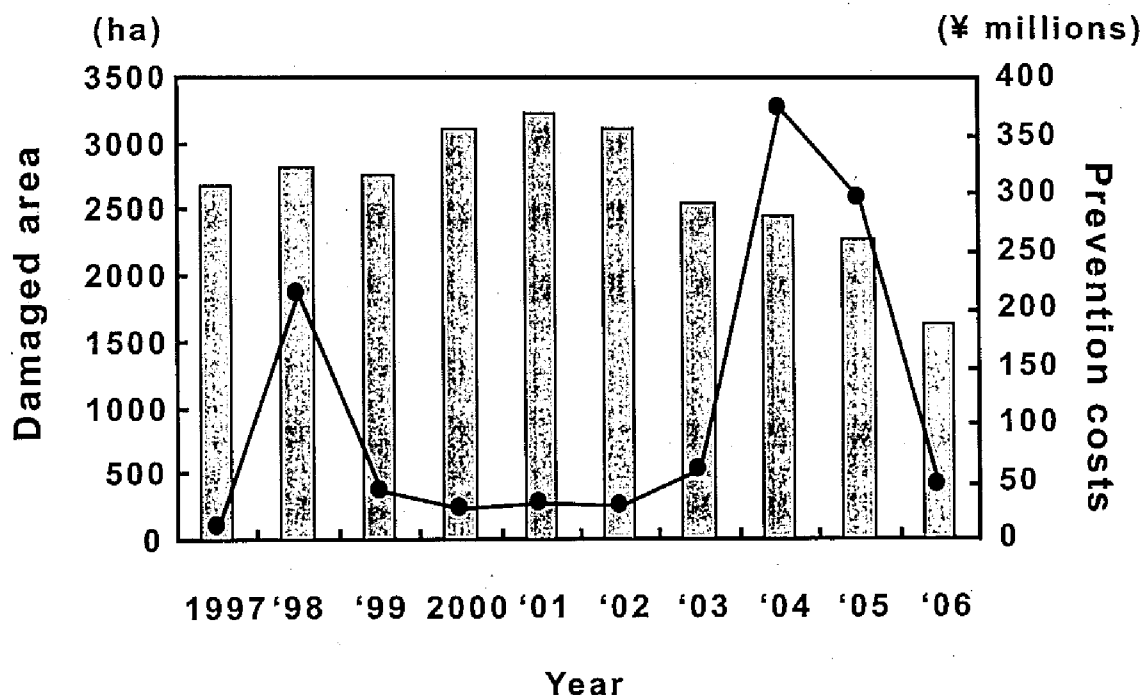


Fig. 1. Yearly Change in the Damaged Area and Prevention Costs by the Vole in Hokkaido.⁵⁻¹⁴⁾

● and □ indicate damaged area and prevention costs, respectively.

から F₁ の苗を判別しているが、各性質の頻度分布は連続的であり¹⁸⁾、完全に判別することはできていない。そのため、現在行われている雑種識別法の改良あるいは新たな雑種識別法の確立が期待されている。森口ら^{22, 23)}と来田ら²⁴⁾は、分子マーカーを用いた F₁ 苗の識別法を報告しているが、DNA マーカーは交雑種の判別に有効なツールである一方、DNA 抽出や分析には時間やコストがかかることが指摘されている²⁵⁾。近年、農業分野では、近赤外分光法が糖度や水分の測定に実用化されている。試料を非破壊的に分析できる分光光度法を苗木の判別に利用することができれば、簡便・迅速・低コストの苗木生産が可能になる。

北海道では、これまでにグイマツ、カラマツ及びそれらの F₁ の精英樹を選抜してきた。しかし、これらの樹種の樹種特性と化学成分の関連性及び化学成分の育種的遺伝特性に関する研究は少ない。グイマツ、カラマツ及び F₁ の抽出物に関しては、耐そ性の観点から幾つかの報告がある²⁶⁻³¹⁾。助野ら³⁰⁾はジテルペン、特に larixol と 13-epimanool に耐そ性があることを報告している。林ら²⁸⁾は樹皮のエーテル抽出物含有量がグイマツ×グイマツに多く、カラマツ×カラマツには少ないこと、さらに、それらの交雑種であるグイマツ×カラマツとカラマツ×グイマツではグイマツ×グイマツとカラマツ×カラマツの中間の含有量であったことから、これら針葉樹の樹皮のエーテル抽出物含有量は家系間で大きく異なり、遺伝的影響を受けていると述べている。また、関ら³²⁾はグイマツとカラマツの種内及び種間交配家系において、樹皮中のジテルペン含有量が異なることを報告している。

樹木の判別に関する研究は、ジテルペンの組成や含有量を基にした天然スギの地理的差異³³⁾、*Thujopsis dolabrata* var. *hondae* における健全木と羅病木の判別³⁴⁾、*Pinus pinaster* における精英樹の判別³⁵⁾、モノテルペンとセスキテル

ペン組成を基にした *Pinus brutia* (Ten)、*Pinus halepensis* (Ten) 及びそれらの交雑種の判別³⁶⁾ に関して行われている。しかしながら、苗木の化学成分を基にした雑種の判別に関する研究はほとんど行われていない。そこで、著者は針葉樹の樹種特性と化学成分との関連性を明らかにすることを目的として、北海道産針葉樹であるグイマツ雑種 F₁ 交配家系に含まれる脂質関連物質と樹種特性の関連性について研究を行った。

本研究では特にグイマツ、カラマツ及び F₁ の成木及びグイマツと F₁ の苗木の化学成分について調べ、さらに、それら化学成分を基にした F₁ 苗の判別の可能性を多変量解析により検討した。化学成分としては、樹種間の含有量に違いが報告されているジテルペンのほか、ジテルペンと同様にメバロン酸から生合成されるステロール (Fig. 2)、並びにステロールと同様に脂質である脂肪酸に着目した。これらジテルペン、ステロール及び脂肪酸は、植物の代謝経路において、解糖系に由来するアセチル CoA から生合成される (Fig. 2)。そこで、本研究では、第Ⅱ章でジテルペン組成について、第Ⅲ章で脂肪酸組成について、第Ⅳ章でステロール組成について分析し、それらによる樹種の判別の可能性を検討した^{37, 38)}。第Ⅳ章ではさらに、カラマツカルスを用いて培地へのメバロン酸添加実験を行い、カルス内におけるステロールの挙動を検討した³⁹⁾。

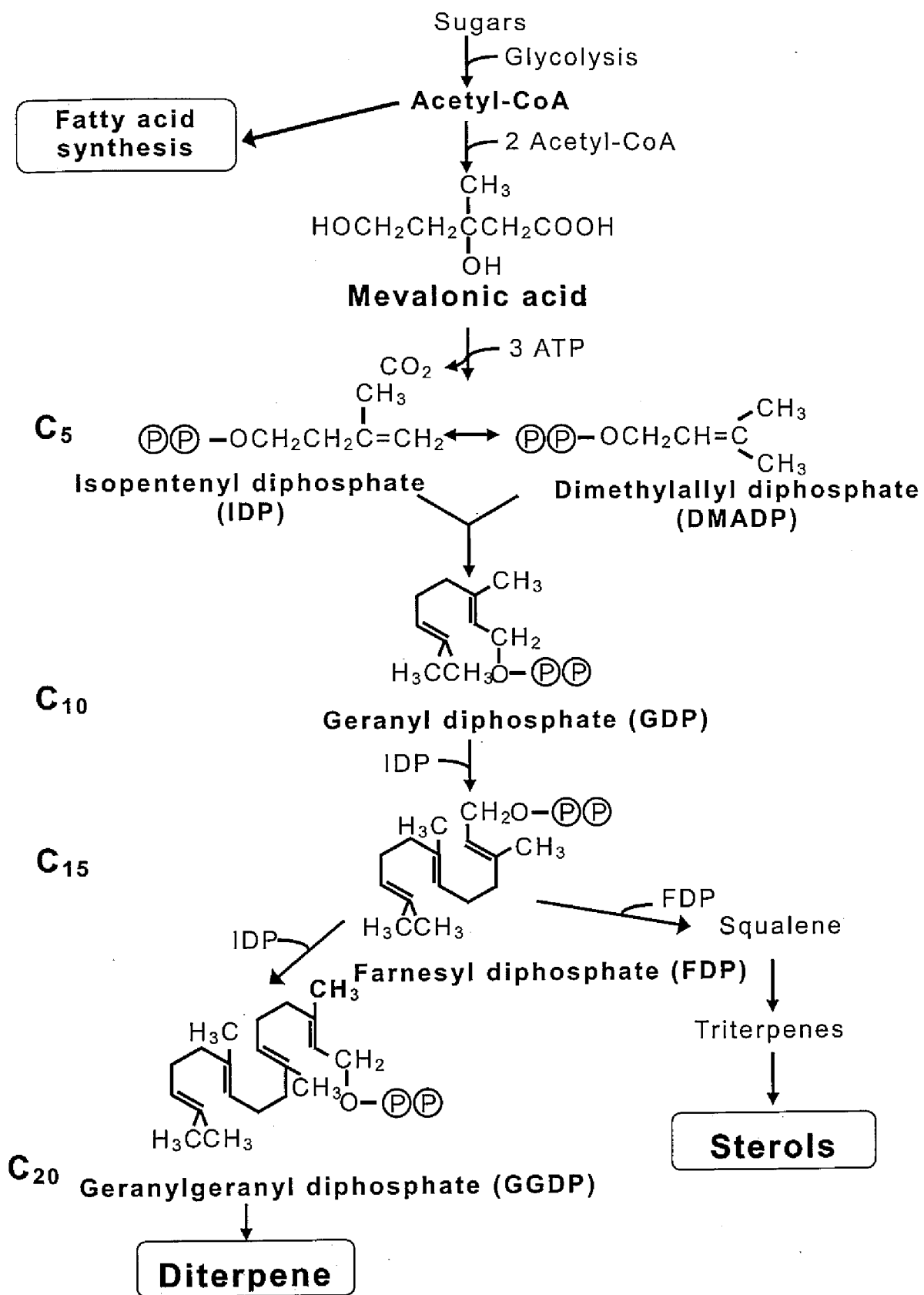


Fig. 2. Origin of the Terpenoid Classes in Plants.⁴⁰⁾

II. グイマツ雑種 F_1 人工交配家系におけるジテルペンの遺伝特性並びにそれらによる樹種判別

林ら²⁸⁾及び関ら³²⁾は、グイマツとカラマツの種内及び種間交配家系では樹皮中のジテルペン含有量が異なることを指摘している。このことは、ジテルペン含有量が遺伝的に樹種間で異なることを示唆していると考えられる。そこで、著者はグイマツ、カラマツ及びそれらの人工交配雑種 F_1 の判別においてジテルペン含有量が有効な指標になると考え、ジテルペン含有量による樹種の判別方法を検討した。

テルペンを基にした樹木の判別に関する研究は、幾つか行われているが^{33~36)}、苗木のジテルペン含有量を基にした雑種の判別に関する研究は行われていない。

第II章ではグイマツ、カラマツ及びそれらの人工交配雑種 F_1 の成木の枝の樹皮におけるジテルペン組成を調べ、ジテルペンによる判別法を確立した。さらに、その判別法を用いて、グイマツとカラマツの雑種採種園産種苗の雑種判別を行い、苗木判別における有効性を検討した³⁷⁾。

実験方法

1. 材料

成木の試料採取は2005年9月に北海道立林業試験場(北海道美幌市; 43°28'N, 141°88'E)で行った(Fig. 3)。32年生グイマツクローン(樺岡168, 2ラメット; 豊岡111, 4ラメット)及び46年生カラマツクローン(十勝16, 5ラメット; 十勝35, 5ラメット)、そしてグイマツ×カラマツの11年生F₁雑種2家系(樺岡168×十勝16, 5個体; 豊岡111×十勝35, 6個体)から枝を採取した。

一方、実生の試料は、グイマツとカラマツがランダムに混植された雑種採種園で生産された種子から得られた二年生種苗を用いた。この雑種採種園は、1974年に北海道有林網走東部森づくりセンターに造成され、試料採取当時の樹高は、グイマツが約18m、カラマツが約16mであった。2004年8月に雑種採種園のグイマツから自然交配種子を採取し、得られた種子を2005年5月に林業試験場苗畑に母樹別に播種した(Fig. 4)。雑種採種園産種苗には雑種個体と純粋なグイマツ個体が混在しているため、2005年10月上旬に少量の葉を用いてDNAマーカーによる苗木識別を行った後、2006年9月にジテルペン分析用の枝を採取した。分析に使用した実生苗は、5母樹(中標津660, 中標津121, 樺岡484, 樺岡455, 留辺蕊28)由来の1母樹あたりグイマツ個体が24~26個体、雑種個体が6~25個体、計209個体である。採取した試料は凍結保存し、分析には枝の樹皮及び葉を使用した。

2. DNAマーカーによる苗木の雑種判別

森口ら²³⁾の方法に従って、葉緑体DNAの*rbcL*領域をIIプライマー⁴¹⁾で増幅し、増幅断片を制限酵素*TaqI*で消化したPCR-RFLPマーカーII-*TaqI*を用



Fig. 3. The Adult Trees of *Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg. (Left) and *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr. (Right).



Fig. 4. The Seedlings of *Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg. and *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

いて、あらかじめ苗木の雑種判別を行った。

全 DNA は CTAB 法⁴²⁾により、苗木の新葉から抽出した。PCR の増幅は、20 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0)、50 nmol/l KCl、2 mmol/l MgCl₂、0.3 mmol/l 各 dNTP、0.3 μmol のプライマーII、30 ng の鋳型 DNA、2.5 unit の *Taq* polymerase (Promega 社製) を含む 25 μl の反応系で、94℃で6分間の後、94℃ 45秒、55℃ 45秒、70℃ 3分30秒を35サイクル、72℃ 10分で GeneAmp PCR System (model 9700, Applied Biosystems 社製) を使用して行った。

PCR で得られた増幅産物のうち、10 μl を用いて、エチジウムブロマイドを含む 2% (w/v) アガロースゲル (TAE 緩衝液) で電気泳動を行い、UV トランスイルミネーターで増幅確認を行った。増幅確認後、残りの 15 μl の PCR 産物を制限酵素 *TaqI* を用いて消化した。制限酵素処理は、15 μl の PCR 産物に 1.7 μl の 10×制限酵素バッファー (Promega 社製)、5 U の制限酵素 *TaqI*、0.17 μl の Bovine Serum Albumin (BSA) を加え、65℃で2時間行った。制限酵素処理後、増幅確認時と同様の方法で電気泳動を行い、多型を検出した。

3. ジテルペンの分析

標準の abietic acid と dehydroabietic acid は和光純薬工業社から、neoabietic acid 及び isopimaric acid はそれぞれ Sigma 社と Helix Biotech 社から購入し、適宜シリカゲルクロマトグラフィー及び再結晶により精製した。13-epimanol, larixol, larixyl acetate、13-epitorulosyl acetate は、グイマツ樹皮ジクロロメタン抽出物からシリカゲルカラムクロマトグラフィー、または液体クロマトグラフィーを用いて単離精製し、それらの構造は GC-MS (JMS-600H, 日本電子社製) 及び NMR (JNM-AL400, 日本電子社製) により確認した (関, 未発表)。

ジテルペンの抽出は、Hansson ら⁴³⁾の方法に従って行った。ホモジナイザー

((株)日本精機製作所製) により樹皮及び葉を液体窒素中で粉碎し、凍結乾燥した。内部標準として 400 μg 及び 50 μg の heptadecanoic acid (Aldrich 社製) を含む 2 ml の石油エーテル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) を 100 mg の樹皮及び葉粉末にそれぞれ加え、10~15 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間超音波抽出した。抽出物を遠心分離し、上清を窒素気流下で乾固し、ジアゾメタンによりメチル化した。メチル化した試料は GC-MS (JMS-600H, 日本電子社製) を用い、DB-1MS (30 m \times 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm ; Agilent 社製) により分析した。カラムは 170 $^{\circ}\text{C}$ から 266 $^{\circ}\text{C}$ まで 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温した。ヘリウムをキャリアガスとし、注入口温度は 270 $^{\circ}\text{C}$ 、イオン化電圧は 70 eV とした。ピークの同定は標品の保持時間及びマススペクトルとの比較により行い (Table 1)、定量は検量線法により行った。分析は 3 回行い、平均値と標準偏差を示した。

4. 統計解析

グイマツ、カラマツ及び F_1 間のジテルペン含有量の多重比較は Tukey-Kramer の HSD 検定 ($P < 0.05$) により行った。また、ジテルペン含有量による雑種判別の有効性を検証するため、線形判別分析を行った。以上の統計解析には JMP 5.0.1J (SAS Institute 社製) を使用した。

Table 1. Characteristic MS Fragments of Diterpenes

Diterpene	RT ^a (min)	Characteristic fragment (<i>m/z</i> , relative intensity (%))
13-Epimanool	9.34	55 (37), 69 (44), 81 (72), 137 (100), 257 (57), 272 ([M-H ₂ O] ⁺ , 30)
Larixol	12.33	69 (100), 71 (44), 153 (59), 195 (1), 255 (38), 270 (28), 273 (26), 288 ([M-H ₂ O] ⁺ , 27)
Isopimaric acid methyl ester	13.12	241 (100), 257 (76), 287 (23), 301 (24), 316 (M ⁺ , 65)
Dehydroabietic acid methyl ester	13.41	239 (100), 255 (7), 299 (26), 314 (M ⁺ , 18)
Larixyl acetate	14.14	71 (37), 153 (100), 195 (16), 255 (65), 270 (43), 273 (9), 288 ([M-H ₂ O-CH ₃ CO] ⁺ , 13)
Abletic acid methyl ester	14.31	241 (52), 256 (100), 301 (7), 316 (M ⁺ , 96)
13-Epitorulosyl acetate	15.17	81 (53), 135 (100), 161 (22), 257 (50), 270 (13), 302 (12), 315 (10), 330 ([M-H ₂ O] ⁺ , 17)
Neoabietic acid methyl ester	15.22	135 (100), 148 (26), 181 (16), 257 (12), 316 (M ⁺ , 74)

^a Retention times: DB-1MS capillary column; column temperature, programmed from 170°C to 266°C at 5°C/min.

実験結果

1. DNA マーカーによる雑種判別

マツ科では、葉緑体は父性遺伝、ミトコンドリアは母性遺伝するため⁴⁴⁻⁴⁷⁾、グイマツとカラマツを識別する葉緑体とミトコンドリアの PCR-RFLP マーカーを使用すれば、グイマツと F₁ を明確に判別することができる。そこで、PCR-RFLP マーカー *H-TaqI* を用いてグイマツ及びカラマツのクローンの遺伝多型を検出した (Fig. 5)。その結果、グイマツでは約 500 bp に、カラマツでは約 650 bp に種特異的なフラグメントが検出することができ、花粉親の判別が可能なが示された。

2. 成木のジテルペン組成

樹皮の石油エーテル-ジエチルエーテル抽出物のメチル化物を GC-MS に供した結果を Fig. 6 に示す。ジテルペンとして 13-epimanol, larixol, larixyl acetate, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid の 8 種が認められた (Fig. 7)。各樹皮のジテルペン組成及び含量の平均値を Table 2 に示す。グイマツでは 2 クローンに共通して 50% 以上のジテルペンを larixol が占め、それに abietic acid が続いた。カラマツでは abietic acid が 50% 以上を占め、次に dehydroabietic acid が多かった。2 家系の F₁ ではそれぞれ larixol または abietic acid が最も多かったが、それらの割合は両親であるグイマツとカラマツの間に位置していた。これらのジテルペンを labdane 型 (13-epimanol, larixol, larixyl acetate, 13-epitorulosyl acetate)、pimarane 型 (isopimaric acid) 及び abietane 型 (abietic acid, dehydroabietic acid, neoabietic acid) ジテルペンの 3 種に分類すると (Fig. 7)、グイマツでは

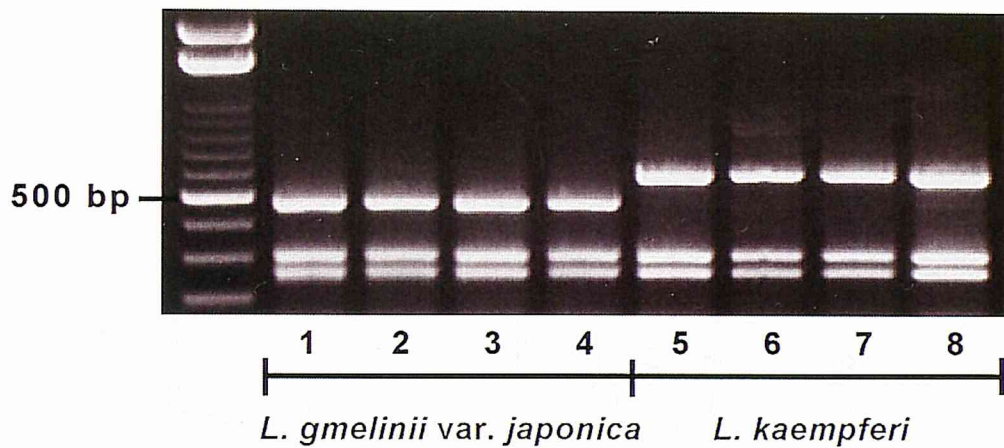


Fig. 5. Species Diagnostic Polymorphisms of the cpDNA *II-TaqI* Markers in Both *Larix* Species Revealed by Electrophoretic Separation in a 2% Agarose Gel (Modified from Moriguchi *et al.*, 2008²³).

Lanes 1-4 and 5-8 represent *L. gmelinii* var. *japonica* and *L. kaempferi* individuals, respectively. The molecular weight marker to the left is a 100-base ladder.

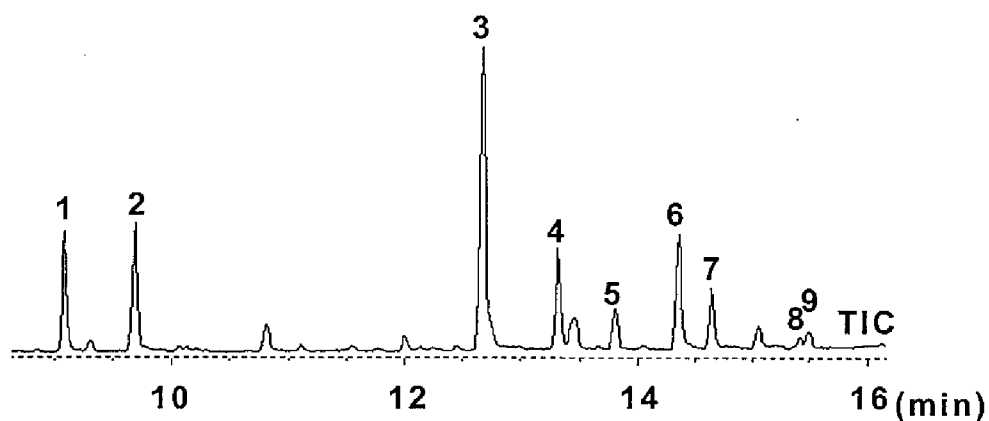


Fig. 6. Total Ion Chromatogram of Diterpenes from Larch F₁ Hybrid Bark (Toyooka 111 × Tokachi 35).

Peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, and 9 correspond to heptadecanoic acid methyl ester (internal standard), 13-epimanol, larixol, isopimaric acid methyl ester, dehydroabietic acid methyl ester, larixyl acetate, abietic acid methyl ester, 13-epitorulosyl acetate, and neoabietic acid methyl ester, respectively.

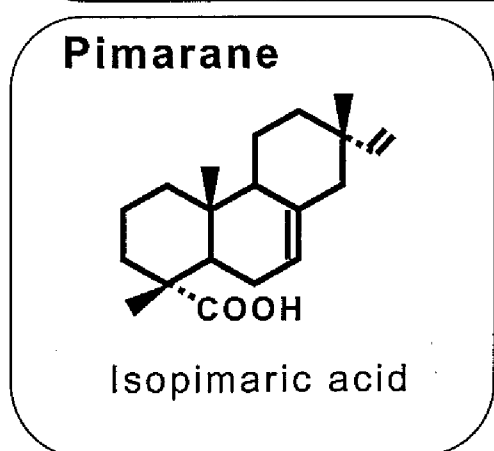
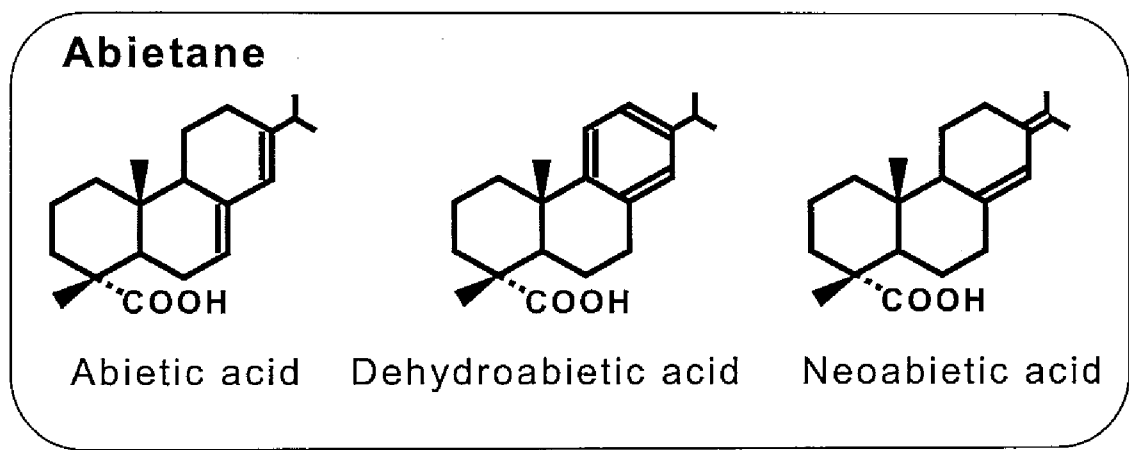
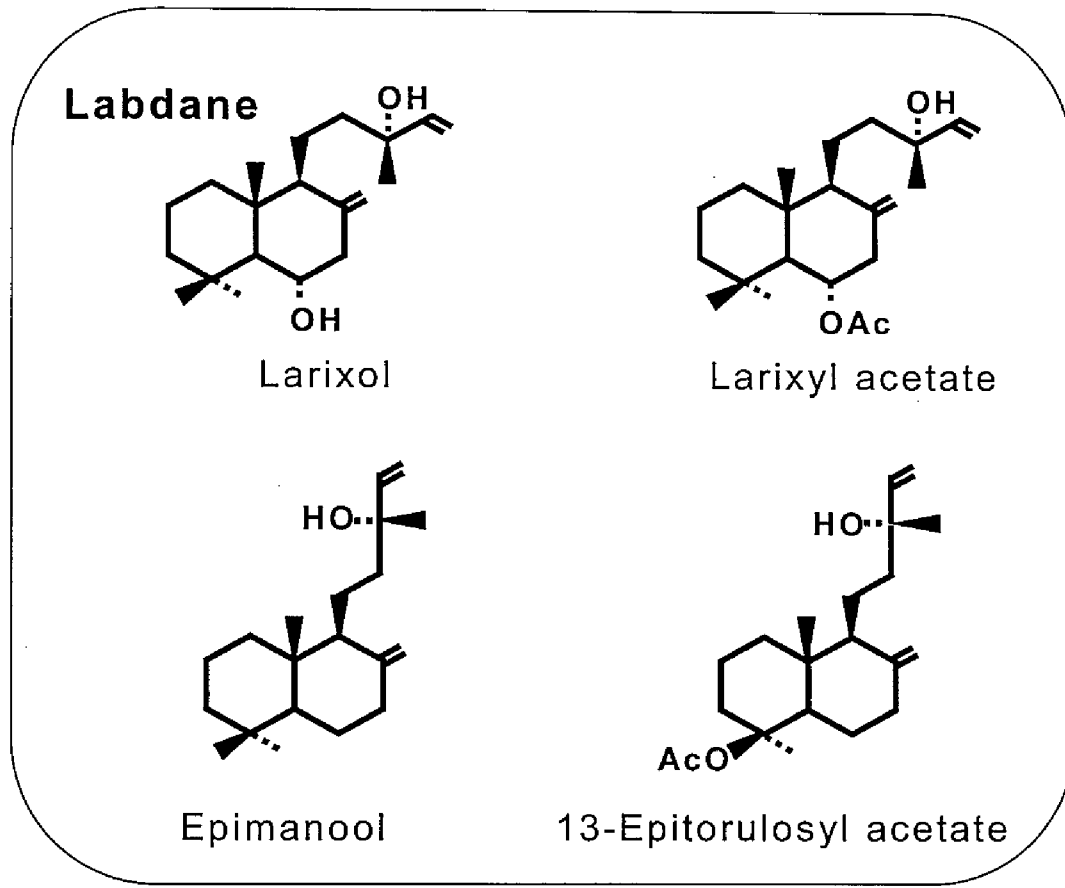


Fig. 7. Structures of Three Types of Diterpenes in the Bark.

Table 2. Diterpene Compositions (mol%±S.D.) and Contents in the Bark of Adult Tree Branches

Diterpene	Toyooka 111 family			Kabaoka 168 family		
	<i>L. gmelinii</i> ^{a, c}	F ₁ ^{b, d}	<i>L. kaempferi</i> ^e	<i>L. gmelinii</i> ^{a, f}	F ₁ ^{b, e}	<i>L. kaempferi</i> ^e
13-Epimanool	9.0± 1.9	8.5± 4.0	3.4± 1.1	7.4± 1.6	4.1± 0.7	2.7± 0.3
Larixol	55.3± 4.9	26.1±14.0	3.2± 1.8	52.3± 4.0	15.7± 7.9	3.5± 0.8
Larixyl acetate	7.5± 0.8	6.2± 1.5	5.1± 1.3	9.3± 1.4	6.2± 2.8	8.9± 0.6
13-Epitorulosyl acetate	0.0± 0.0	10.4± 8.7	tr. ^h	0.0± 0.0	5.5± 8.1	4.5± 0.7
Isopimaric acid	6.1± 0.5	9.0± 2.0	9.3± 1.3	4.7± 0.6	9.7± 1.1	1.7± 1.1
Abietic acid	13.9± 2.2	23.8± 8.1	52.0±10.1	15.3± 3.0	32.6± 5.4	58.5± 4.6
Dehydroabietic acid	3.6± 2.4	11.9± 4.6	20.1± 7.9	4.7± 1.6	16.8± 5.8	13.6± 2.5
Neoabietic acid	4.7± 1.2	4.1± 1.3	7.0± 1.0	6.3± 2.2	9.4± 2.3	6.6± 0.8
Labdane type ^g	344.0±50.3 ^A	98.2±58.0 ^B	12.6± 6.4 ^C	333.3±92.6 ^A	47.9±18.7 ^B	20.7± 6.5 ^B
Pimarane type ^g	29.2± 4.4 ^A	15.3± 4.7 ^B	9.7± 4.4 ^B	22.0± 1.9 ^A	14.1± 2.6 ^B	14.8± 2.3 ^B
Abietane type ^g	108.0±31.4 ^A	70.7±29.0 ^A	88.0±47.8 ^A	124.3±10.2 ^{A, B}	86.5±20.2 ^B	131.3±27.5 ^A
Total diterpenes ^g	481.2±78.3 ^A	184.2± 88.3 ^B	110.3± 58.4 ^B	479.6±104.7 ^A	148.5± 37.4 ^B	166.8± 34.4 ^B

Means ± S.D.

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.^c $n = 4$, ^d $n = 6$, ^e $n = 5$, ^f $n = 2$.^g nmol/bark mg.^h < 0.1%.

labdane 型が約 70%、カラマツでは abietane 型が約 80%を占めていた。一方、2 家系の F₁ では、labdane 型が 51%と 32%、abietane 型が 40%と 59%であり、これらの数値はそれらの両親の間であった。

総ジテルペン含有量は、豊岡及び樺岡両家系において F₁ (184.2 及び 148.5 nmol/bark mg) がグイマツ (それぞれ 481.2 及び 479.6 nmol/bark mg) よりも有意に低かった (Tukey-Kramer HSD test, $P < 0.05$) (Table 2)。

葉では、13-epitorulosyl acetate を除く 7 種のジテルペンが認められた (Table 3)。グイマツは、F₁ とカラマツに比べ larixol 含有率が有意に高かったが、樹皮に見られたような傾向は 3 樹種間に認められなかった。葉の総ジテルペン含有量は 2~6 nmol/leaf mg であり、樹皮に比べて顕著に少なかった。

3. ジテルペン含有量による成木の樹種判別

4 ラメットの豊岡 111、5 ラメットの十勝 35、6 個体の豊岡 111×十勝 35、2 ラメットの樺岡 168、5 ラメットの十勝 16 及び 5 個体の樺岡 168×十勝 16 の全 27 個体の樹皮に含まれる 8 種のジテルペン (13-epimanol, larixol, larixyl acetate, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid) の含有量を基に線形判別分析を行った結果を Fig. 8 に示す。多変量平均の 95%信頼区間を示す図中の円は 3 樹種間で離れており、樹種間に有意な差が認められた。この判別分析の誤判別率は 0%であり、ジテルペン含有量によって、樹種の判別が可能なが示された。

葉に含まれる 7 種のジテルペン (13-epimanol, larixol, larixyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid) の含有量を基にグイマツ、カラマツ及び F₁ の 3 樹種について線形判別分析を行った結果、この判別分析の誤判別率は 7.4%であった (Fig. 9)。同様にグイマツと F₁

Table 3. Diterpene Compositions (mol%±S.D.) and Contents in the Leaf of Adult Trees

Diterpene	Toyooka 111 family			Kabaoka 168 family		
	<i>L. gmelinii</i> ^{a, c}	F ₁ ^{b, d}	<i>L. kaempferi</i> ^e	<i>L. gmelinii</i> ^{a, f}	F ₁ ^{b, e}	<i>L. kaempferi</i> ^e
13-Epimanool	12.6±1.4	9.4±3.3	9.5±1.4	7.8±0.2	7.1± 1.2	6.8±1.9
Larixol	47.1±9.1	27.0±6.6	23.0±3.3	35.8±5.7	7.1± 8.3	6.5±3.0
Larixyl acetate	0.6±1.1	2.1±3.3	5.4±1.0	0.0±0.0	0.0± 0.0	0.0±0.0
Isopimaric acid	10.5±1.4	14.8±2.3	19.9±2.8	19.2±2.4	27.6± 4.6	27.8±1.5
Abietic acid	12.6±2.1	12.2±2.0	15.2±5.0	13.0±0.3	20.2± 6.9	18.3±3.5
Dehydroabietic acid	14.5±2.9	10.8±3.3	12.3±2.8	15.0±1.0	21.3± 4.1	38.3±2.5
Neoabietic acid	2.2±2.8	23.8±6.0	14.7±4.3	9.2±2.8	16.7±10.5	2.4±1.2
Labdane type ^g	1.4±0.4 ^B	1.5±0.5 ^B	2.4±0.4 ^A	2.0±0.1 ^A	0.6± 0.5 ^B	0.7±0.2 ^B
Pimarane type ^g	0.2±0.1 ^C	0.5±0.1 ^B	1.2±0.1 ^A	0.9±0.3 ^A	0.9± 0.3 ^A	1.4±0.3 ^A
Abietane type ^g	0.7±0.3 ^C	1.7±0.4 ^B	2.7±0.6 ^A	1.7±0.5 ^A	1.9± 0.6 ^A	3.0±0.9 ^A
Total diterpenes ^g	2.3±0.6 ^C	3.8±0.6 ^B	6.3±0.8 ^A	4.6±0.9 ^A	3.4±1.3 ^A	5.1±1.4 ^A

Means ± S.D.

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

^c $n = 4$, ^d $n = 6$, ^e $n = 5$, ^f $n = 2$.

^g nmol/leaf mg.

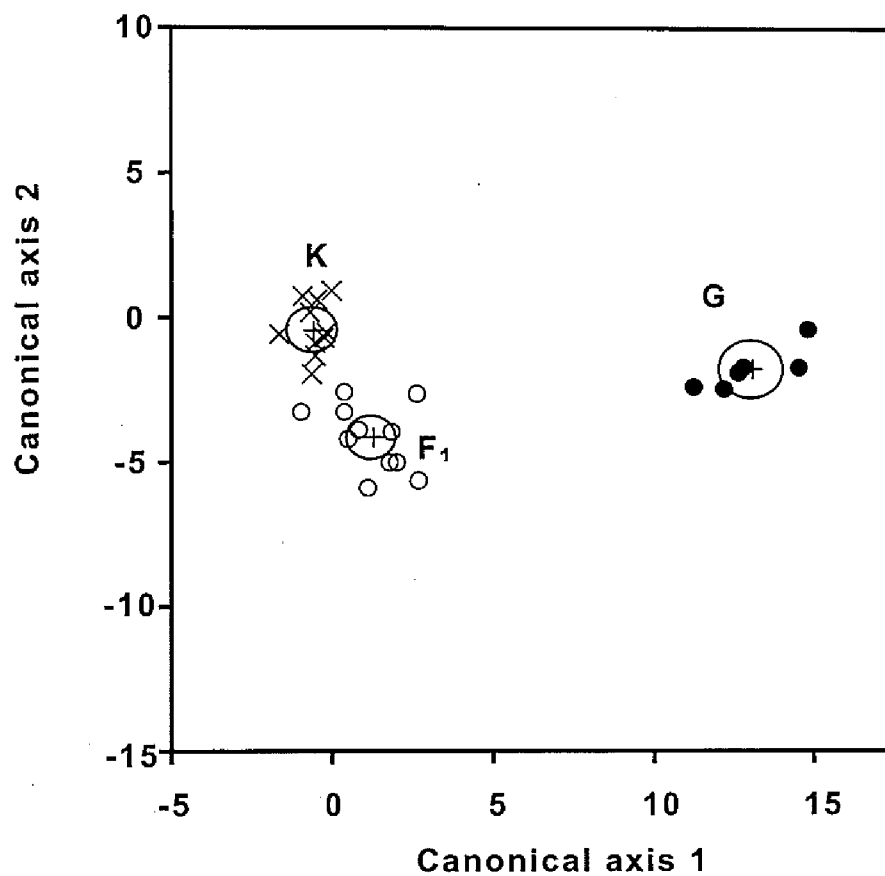


Fig. 8. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Branch Bark of Mature *L. gmelinii* var. *japonica* (G), *L. kaempferi* (K), and the F₁.

●, ×, and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica*, *L. kaempferi*, and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

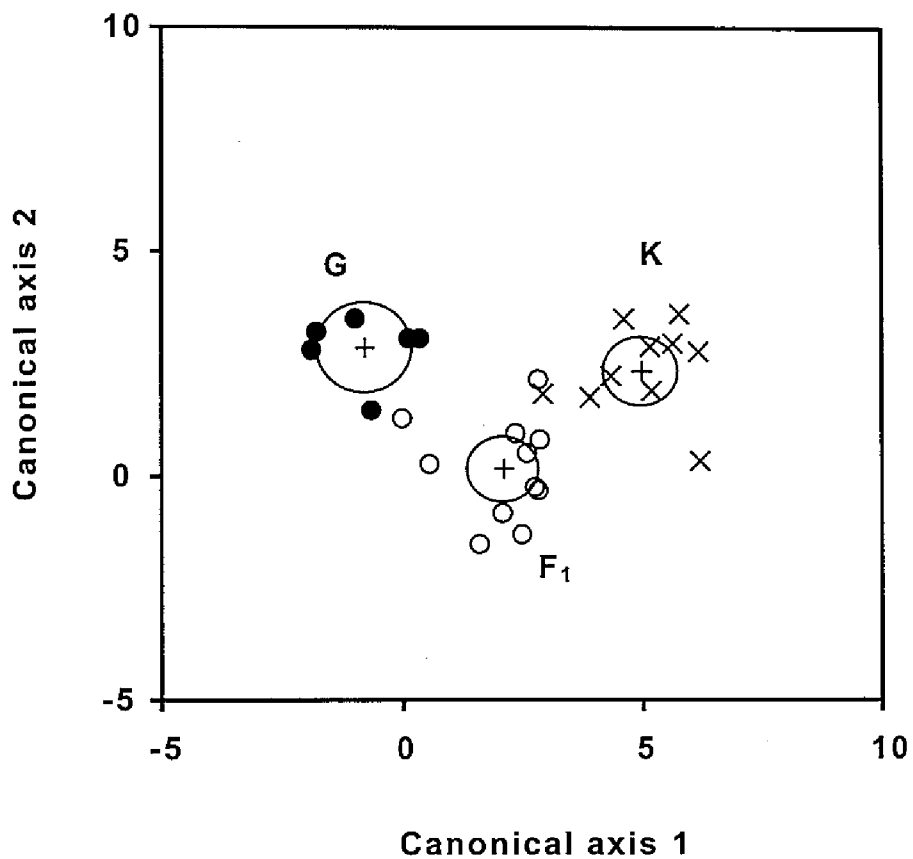


Fig. 9. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Leaf of Mature *L. gmelinii* var. *japonica* (G), *L. kaempferi* (K), and the F₁.

•, ×, and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica*, *L. kaempferi*, and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

の2樹種について線形判別分析を行ったところ、誤判別率は0%であり、グイマツとF₁の判別は可能であった (Fig. 10)。

4. 苗木のジテルペン組成

苗木の樹皮には 13-epimanol, larixol, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid の7種のジテルペンが認められたが、larixyl acetate は検出されなかった (Table 4)。グイマツでは成木と同様に larixol が最も多く、42~48%であった。F₁ では abietic acid が36~53%と最も多く、larixol (16~33%) がそれに続いた。グイマツでは labdane 型ジテルペンが51~59%であり、成木 (約70%) より少なかった。F₁ では abietane 型が50~65%を占めた。

5 家系の苗木の枝の樹皮の総ジテルペン含有量は、グイマツでは 141~351 nmol/bark mg で、成木 (480~481 nmol/bark mg) に比べてかなり少なかった (Table 4)。F₁ のジテルペン含有量は 110~215 nmol/bark mg であり、グイマツよりも少なかった。

苗木の葉には 13-epimanol, larixol, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid の7種のジテルペンが認められた (Table 5)。グイマツ及びF₁ともに neoabietic acid が最も多く、前者では54~68%、後者では52~72%を占めた。そのため、両樹種ともに abietane 型ジテルペンが64~84%を占めた。

苗木の葉の総ジテルペン含有量は、両樹種ともに9~15 nmol/leaf mg であり、成木と同様に樹皮よりも顕著に少なかった (Table 5)。

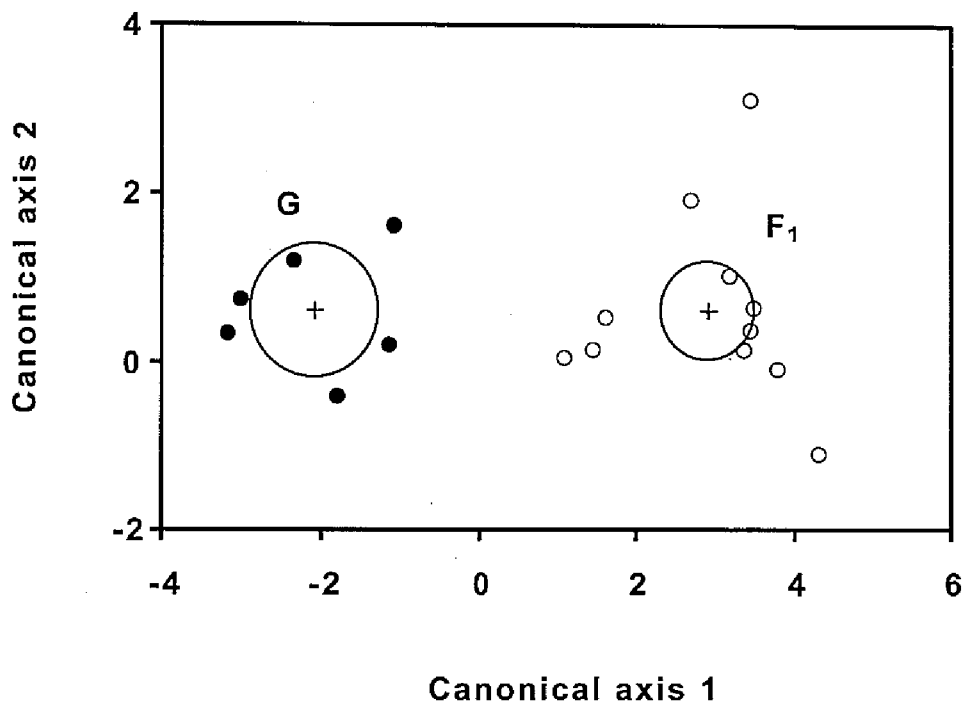


Fig. 10. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Leaf of Mature *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F₁.

● and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

Table 4. Diterpene Compositions (mol%±S.D.) and Contents in the Bark of Seedling Branches

Diterpene	Nakashibetsu 660		Nakashibetsu 121		Kabaoka 484		Kabaoka 455		Rubeshibe 28	
	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,d}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,e}	F ₁ ^{b,d}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,d}	F ₁ ^{b,f}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,g}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,h}
13-Epimanool	13.4± 4.3	3.7± 2.2	9.7± 3.3	2.8± 1.4	10.7± 3.0	6.5± 4.1	8.9± 2.5	8.1± 4.1	7.5± 2.2	5.6± 2.9
Larixol	41.6± 8.2	16.0± 8.2	41.6± 8.8	18.0± 7.0	47.9± 7.3	29.6± 10.0	42.2± 8.3	25.3± 13.7	47.9± 7.5	33.0± 11.6
13-Epitorulosyl acetate	0.1± 0.2	0.5± 0.7	0.1± 0.3	0.2± 0.4	0.1± 0.2	0.5± 0.8	0.0± 0.1	0.2± 0.4	0.2± 0.8	0.8± 2.0
Isopimaric acid	11.7± 2.0	15.2± 3.8	14.3± 3.3	14.5± 3.9	12.4± 1.8	12.2± 2.6	14.0± 3.5	12.0± 4.6	10.1± 2.9	10.9± 1.9
Abietic acid	16.4± 8.2	52.8± 11.6	11.2± 8.8	53.3± 10.8	12.9± 4.4	40.5± 10.8	17.7± 10.1	40.5± 13.2	24.2± 7.3	36.2± 17.5
Dehydroabietic acid	14.2± 7.4	8.9± 6.9	19.6± 10.7	6.4± 5.7	13.1± 5.3	7.3± 4.7	13.8± 6.6	11.9± 8.9	7.5± 3.5	10.6± 9.4
Neoabietic acid	2.5± 1.7	2.8± 1.4	3.5± 2.0	4.8± 2.9	2.9± 1.4	3.4± 2.5	3.3± 2.2	2.2± 1.2	2.6± 1.7	2.9± 2.7
Labdane type ⁱ	90.2± 28.5 ^A	23.8± 11.7 ^B	73.1± 27.6 ^A	22.1± 8.0 ^B	115.0± 60.2 ^A	60.0± 34.6 ^B	86.8± 36.1 ^A	43.8± 28.8 ^B	202.1± 106.1 ^A	82.1± 32.7 ^B
Pimarane type ⁱ	18.7± 6.0 ^A	18.9± 11.9 ^A	20.4± 7.8 ^A	15.4± 5.6 ^B	23.1± 9.2 ^A	20.5± 12.4 ^A	48.1± 43.1 ^A	14.3± 5.5 ^B	32.5± 10.4 ^A	22.6± 8.5 ^A
Abietane type ⁱ	52.8± 20.3 ^B	86.7± 60.7 ^A	47.1± 14.4 ^B	72.5± 32.3 ^A	53.7± 23.1 ^B	85.5± 56.4 ^A	46.2± 25.0 ^A	68.9± 29.9 ^A	116.1± 44.9 ^A	110.2± 68.5 ^A
Total diterpenes ⁱ	159.4± 44.0 ^A	129.4± 75.3 ^A	140.6± 38.3 ^A	110.1± 37.8 ^B	191.8± 87.2 ^A	166.0± 95.4 ^A	182.0± 70.1 ^A	127.0± 44.7 ^B	350.7± 162.0 ^A	214.9± 95.7 ^A

Means ± S.D.

Values not sharing the same superscript letters (A, B) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.^c $n = 26$, ^d $n = 25$, ^e $n = 24$, ^f $n = 15$, ^g $n = 11$, ^h $n = 6$.ⁱ nmol/bark mg.

Table 5. Diterpene Compositions (mol%±S.D.) and Contents in the Leaf of Seedlings

Diterpene	Nakashibetsu 660		Nakashibetsu 121		Kabaoka 484		Kabaoka 455		Rubeshibe 28	
	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,d}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,e}	F ₁ ^{b,d}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,d}	F ₁ ^{b,f}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,g}	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,h}
13-Epimanool	0.2±0.6	0.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.6	0.0±0.0	0.0±0.2	0.7±1.9	0.2±0.3	0.0±0.0
Larixol	5.2±4.6	6.0±5.3	4.9±3.3	3.7±2.8	11.2±5.0	9.3±5.0	9.5±3.0	10.7±4.8	10.0±4.4	9.9±4.6
13-Epitorulosyl acetate	4.4±14.0	0.5±0.7	0.3±0.3	0.3±0.2	0.4±0.6	0.1±0.3	0.1±0.2	0.1±0.2	0.2±0.2	0.1±0.1
Isopimaric acid	19.3±7.7	27.9±8.8	13.8±3.9	12.0±5.2	24.5±7.3	22.4±7.3	14.1±5.5	11.1±4.6	19.7±6.7	19.9±3.8
Abietic acid	8.8±3.7	4.8±3.4	7.0±2.2	5.2±1.4	1.9±1.2	1.4±1.3	0.2±0.3	0.2±0.2	0.4±0.4	0.3±0.3
Dehydroabietic acid	8.3±4.0	8.9±3.0	7.7±5.1	6.7±3.8	6.3±5.0	5.9±3.1	7.7±3.3	5.0±2.0	11.9±6.4	8.0±2.0
Neoabietic acid	53.9±12.7	51.8±11.1	66.3±9.7	72.1±8.2	55.4±12.1	60.9±9.0	68.4±9.1	72.1±8.8	57.5±11.6	61.8±5.1
Labdane type ^l	1.7±3.1 ^A	0.5±0.5 ^A	0.7±0.4 ^A	0.6±0.5 ^A	1.1±0.7 ^A	0.6±0.2 ^B	1.0±0.3 ^A	1.3±0.7 ^A	1.1±0.5 ^A	1.4±0.6 ^A
Pimarane type ^l	2.6±1.0 ^A	2.3±1.0 ^A	1.9±0.8 ^A	1.7±0.8 ^A	2.2±0.8 ^A	1.6±0.9 ^B	1.6±0.9 ^A	1.2±0.5 ^A	2.2±0.8 ^A	2.4±0.7 ^A
Abietane type ^l	10.5±4.7 ^A	5.9±4.1 ^B	11.3±4.9 ^A	12.9±5.1 ^A	5.9±1.6 ^A	4.8±1.6 ^B	8.1±2.3 ^A	8.4±2.7 ^A	7.8±2.6 ^A	9.0±3.0 ^A
Total diterpenes ^l	14.8±6.3 ^A	8.7±4.9 ^B	13.8±5.7 ^A	15.3±5.6 ^A	9.2±2.2 ^A	6.9±2.1 ^B	10.7±2.9 ^A	10.9±2.8 ^A	11.2±3.0 ^A	12.9±3.8 ^A

Means ± S.D.

Values not sharing the same superscript letters (A, B) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.^c $n = 26$, ^d $n = 25$, ^e $n = 24$, ^f $n = 15$, ^g $n = 11$, ^h $n = 6$.^l nmol/leaf mg.

5. ジテルペン含有量による苗木の樹種判別

苗木の樹皮に含まれる 7 種のジテルペン (13-epimanol, larixol, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid) の含有量による、各家系のグイマツ及び F₁ 苗木の判別結果を Fig. 11 に示す。各家系の誤判別率は、中標津 660、中標津 121、樺岡 484、樺岡 455 及び留辺蕊 28 のそれぞれ 0%、2.0%、2.5%、8.1%、15.6%であった。このように、家系により誤判別率は異なるが、成木と同様に苗木においてもほぼグイマツと F₁ を判別することが可能であった。なお、留辺蕊 28 で誤判別率が高かったのは、分析に用いた F₁ の数がグイマツに比べて少ないことや標準偏差が大きいことが原因と考えられる。

これら 5 家系の全個体 (グイマツ, 127; F₁, 82) について判別分析を行ったところ (Fig. 12)、誤判別率は 7.7%であった。このことは、幾つかの家系の苗木が混在していても、枝の樹皮のジテルペン含有量を分析することにより、非常に高い確率で F₁ を判別できることを意味している。

一方、苗木の葉に含まれる 7 種のジテルペン (13-epimanol, larixol, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid) の含有量による、各家系のグイマツ及び F₁ 苗木の判別結果を Fig. 13 に示す。各家系の誤判別率は、中標津 660、中標津 121、樺岡 484、樺岡 455 及び留辺蕊 28 のそれぞれ 21.6%、28.6%、22.5%、13.5%、28.1%であった。

5 家系の全個体 (グイマツ, 127; F₁, 82) について判別分析を行ったところ (Fig. 14)、誤判別率は 35.4%となり、樹皮と比較してかなり高かった。

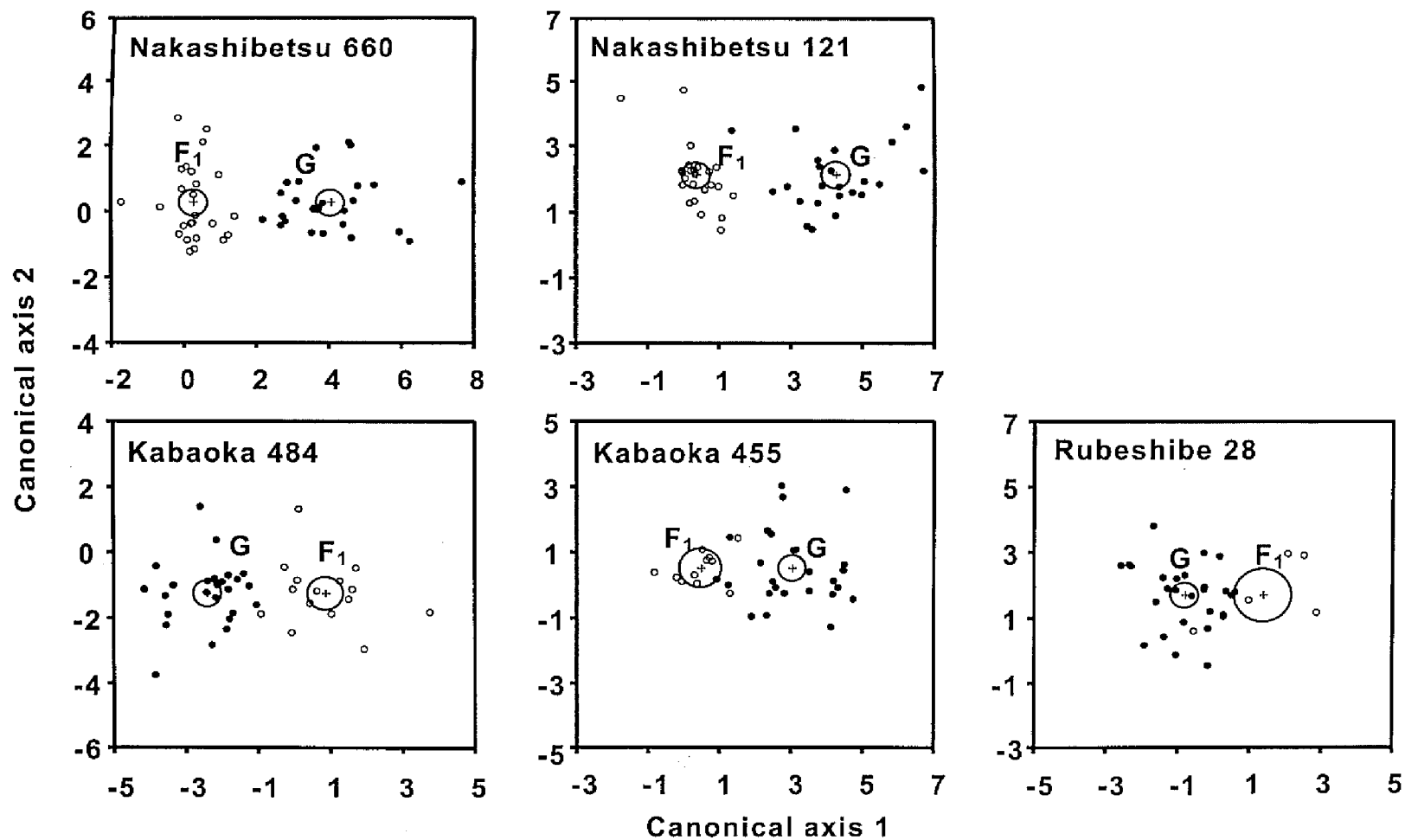


Fig. 11. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Bark of Seedling Branches of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F₁ in Each Family.

● and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

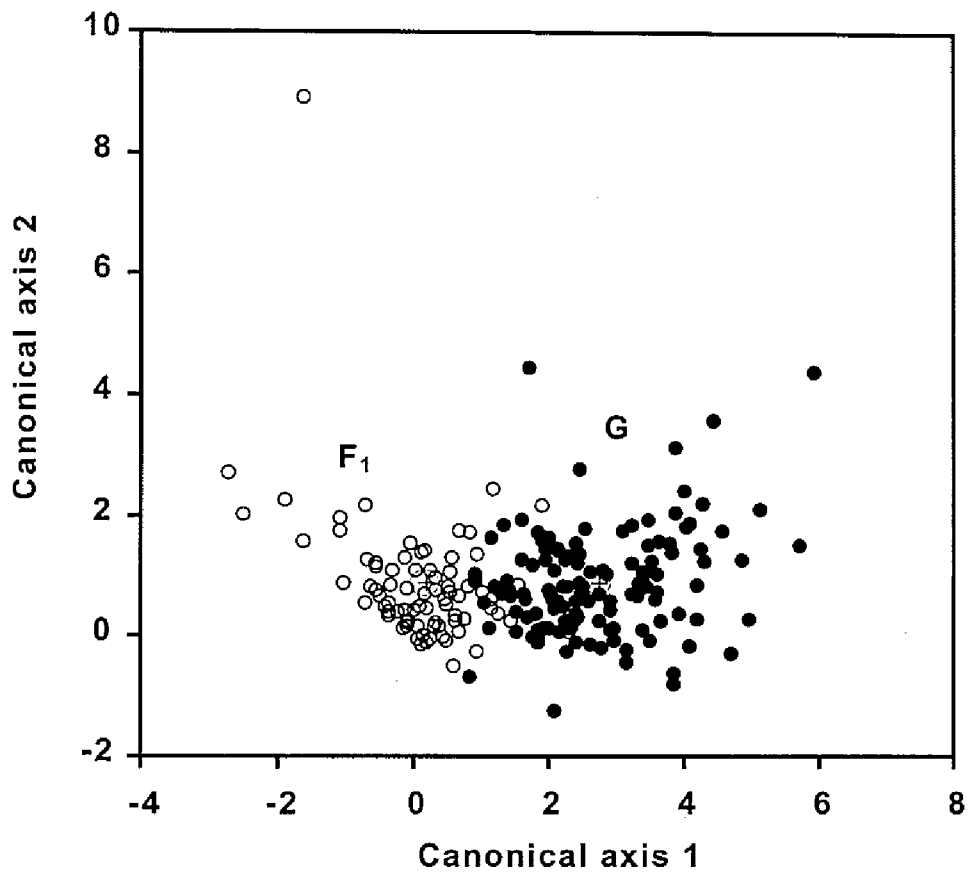


Fig. 12. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Bark of Seedling Branches of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F₁ in Five Families (*L. gmelinii* var. *japonica*, 127 Individuals; F₁, 82 Individuals).

• and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

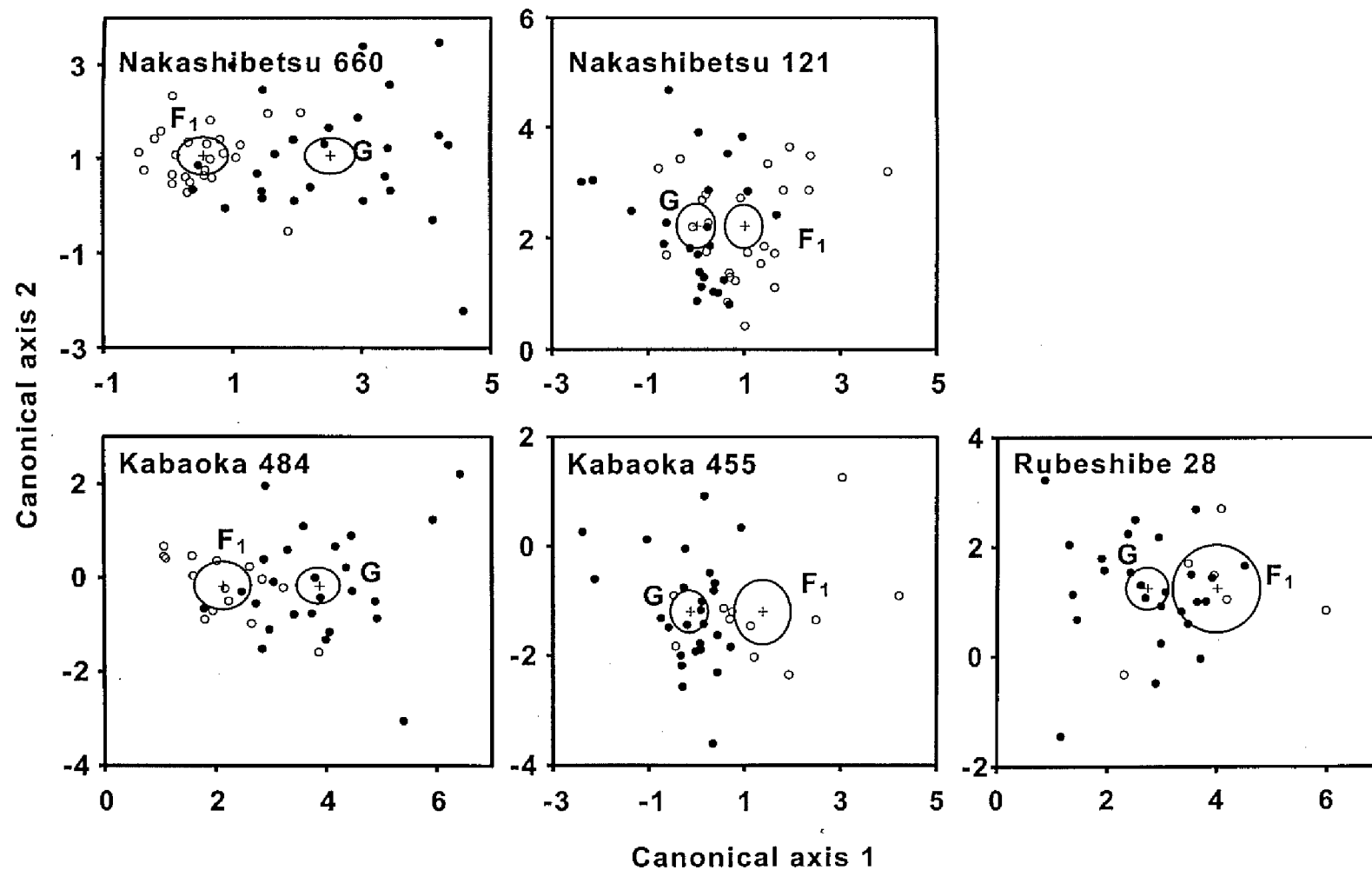


Fig. 13. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Leaf of Seedlings of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F₁ in Each Family.

● and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

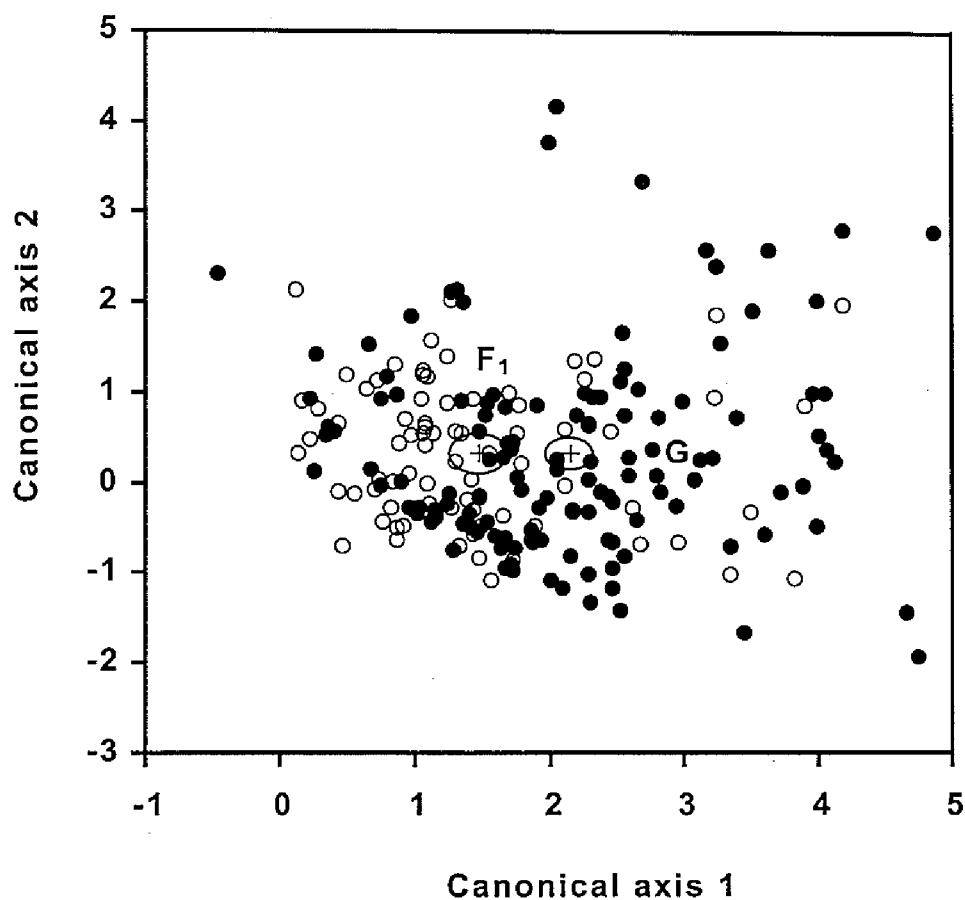


Fig. 14. Linear Discriminant Analysis Using Diterpene Contents in the Leaf of Seedlings of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F_1 in Five Families (*L. gmelinii* var. *japonica*, 127 Individuals; the F_1 , 82 Individuals).

• and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F_1 , respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

6. ジテルペンタイプの比較

供試した樹種による labdane 型、pimarane 型及び abietane 型ジテルペンの合成能を比較するために $\text{labdane}/(\text{pimarane}+\text{abietane})$ 比を算出したところ (Table 6)、成木の場合、グイマツでは 2.5 と 2.3 で、カラマツでは 0.1 であり、樹種間に有意な差が認められた (Tukey-Kramer HSD test, $P<0.05$)。一方、 $\text{abietane}/\text{pimarane}$ 比は、カラマツは 9.1 と 8.9、グイマツでは 3.7 と 5.6 であり、カラマツは有意に高かった (Tukey-Kramer HSD test, $P<0.05$)。また、2 家系の F_1 については、 $\text{labdane}/(\text{pimarane}+\text{abietane})$ 比と $\text{abietane}/\text{pimarane}$ 比ともにそれぞれの両親の中間の値であった。

成木の葉では、2 家系ともに $\text{labdane}/(\text{pimarane}+\text{abietane})$ 比はグイマツが F_1 とカラマツよりも有意に高かったが、 $\text{abietane}/\text{pimarane}$ 比は樹種間に差が認められなかった (Table 7)。

苗木の樹皮のジテルペン組成については、 $\text{labdane}/(\text{pimarane}+\text{abietane})$ 比はグイマツでは 0.9~1.5、 F_1 では 0.2~0.6、 $\text{abietane}/\text{pimarane}$ 比はグイマツでは 1.0~3.6、 F_1 では 4.2~4.9 であり、成木と同様の関係が見られた (Table 8)。

苗木の葉の $\text{labdane}/(\text{pimarane}+\text{abietane})$ 比は樹種間に差がなく、 $\text{abietane}/\text{pimarane}$ 比は樹種間に樹皮のような一定の傾向が認められなかった (Table 9)。

Table 6. Ratios of Diterpene Types of Bark of Adult Tree Branches ^a

Ratio of diterpene type	Toyooka 111 family			Kabaoka 168 family		
	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. kaempferi</i>	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. kaempferi</i>
Labdane/(abietane+ pimarane)	2.5 ^A	1.1 ^B	0.1 ^C	2.3 ^A	0.5 ^B	0.1 ^C
Abietane/pimarane	3.7 ^B	4.6 ^B	9.1 ^A	5.6 ^B	6.1 ^B	8.9 ^A

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

^a Calculated based on Table 2.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^c *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Table 7. Ratios of Diterpene Types of Adult Tree Leaves ^a

Ratio of diterpene type	Toyooka 111 family			Kabaoka 168 family		
	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. kaempferi</i>	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. kaempferi</i>
Labdane/(abietane+ pimarane)	1.6 ^A	0.7 ^B	0.6 ^B	0.8 ^A	0.2 ^B	0.2 ^B
Abietane/pimarane	2.8 ^A	3.2 ^A	2.2 ^A	1.9 ^A	2.1 ^A	2.1 ^A

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

^a Calculated based on Table 3.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^c *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Table 8. Ratios of Diterpene Types of Bark of Seedling Branches ^a

Ratio of diterpene type	Nakashibetsu 660		Nakashibetsu 121		Kabaoka 484		Kabaoka 455		Rubeshibe 28	
	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c
Labdane/(pimarane+abietane)	1.3 ^A	0.2 ^B	1.1 ^A	0.3 ^B	1.5 ^A	0.6 ^B	0.9 ^A	0.5 ^B	1.4 ^A	0.6 ^B
Abietane/pimarane	2.8 ^B	4.6 ^A	2.3 ^B	4.7 ^A	2.3 ^B	4.2 ^A	1.0 ^B	4.8 ^A	3.6 ^B	4.9 ^A

Values not sharing the same superscript letters (A, B) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

^a Calculated based on Table 4.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^c *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Table 9. Ratios of Diterpene Types of Seedling Leaves ^a

Ratio of diterpene type	Nakashibetsu 660		Nakashibetsu 121		Kabaoka 484		Kabaoka 455		Rubeshibe 28	
	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c	<i>L. gmelinii</i> ^b	F ₁ ^c
Labdane/(pimarane+abietane)	0.1 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A	0.0 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A	0.1 ^A
Abietane/pimarane	3.9 ^A	2.7 ^B	6.4 ^B	8.7 ^A	2.9 ^A	3.5 ^A	6.8 ^A	8.5 ^A	4.2 ^A	3.7 ^A

Values not sharing the same superscript letters (A, B) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

^a Calculated based on Table 5.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^c *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

考察

これまでに *Larix* 属のジテルペンについては、オレオレジン (樹皮、材由来樹脂状分泌物)⁴⁸⁻⁵¹、樹皮⁵²⁻⁵³ 及び材⁵⁴ の工業的な利用やケモタキソノミー⁵⁵ の観点から、それらの含有量や組成が研究されている。これらの報告では、*L. decidua* のオレオレジン⁵⁵、グイマツの樹皮⁵³、材⁵⁴ 及びオレオレジン^{48, 49, 55} において *larixol* と *larixyl acetate* の存在が報告されている。今回の研究でもグイマツ樹皮においてそれらの存在が確認された (Table 2)。また、Mills の報告⁵⁵ のように、グイマツには *epitorulosol* 及び *epitorulosyl acetate* が存在しなかった (Table 2)。カラマツのオレオレジンには、Bol'shakova らが *larixol* と *larixyl acetate* の存在を示しているが⁵⁰、Mills の研究ではそれらの存在が認められていない⁵⁵。今回の結果では、分析したカラマツの全個体の樹皮に *larixol* または *larixyl acetate* が存在しており (Table 2, 個体別のデータは非掲載)、Bol'shakova らの結果⁵⁰と一致した。また、Mills は、*epitorulosol* 及び *epitorulosyl acetate* は、*larixol* 及び *larixyl acetate* の存在しない樹種に存在していると述べている⁵⁵。ここではグイマツ 2 クローンとカラマツの 1 クローン (十勝 35) においてそのような結果となった。しかしながら、カラマツの 1 クローン (十勝 16) では *larixol* と *larixyl acetate* とともに *epitorulosyl acetate* が存在しており、このことはすべてのカラマツには適していない。これらのことからカラマツにおける *larixol*、*larixyl acetate* 及び *epitorulosyl acetate* の存在の有無はカラマツの個体や家系によって違いがあると考えられた。

Labdane 型 (13-epimanol, *larixol*, *larixyl acetate*, 13-*epitorulosyl acetate*)、pimarane 型 (*isopimaric acid*) 及び abietane 型 (*dehydroabietic acid*, *abietic acid*, *neoabietic acid*) ジテルペンの割合はグイマツ、カラマツ及び F₁ で違いが

認められた (Table 2)。Croteau と Johnson⁴⁰⁾ が示したジテルペンの生合成経路 (Fig. 15) を基に、labdane 型、pimarane 型及び abietane 型ジテルペンの代謝流を比較すると (Table 6)、成木ではグイマツの labdane/(pimarane+abietane) 比はカラマツより高いことから、前者では後者と比べて copalyl diphosphate (CDP) から labdane 型ジテルペンの合成流量が多いことが示唆された。一方、abietane/pimarane 比は、グイマツよりカラマツで高く、カラマツではグイマツよりも pimarane を経た abietane 型ジテルペンへの合成流量が多いと考えられる。また、2 種の F₁ については、labdane/(pimarane+abietane) 比と abietane/pimarane 比ともにそれぞれの両親の中間の値であり、ジテルペンの代謝流は遺伝的に両親の影響を受けていると考えられた。

苗木の樹皮の labdane/(pimarane+abietane) 比と abietane/pimarane 比は成木と同様の傾向を示しており (Table 8)、グイマツと F₁ におけるジテルペン代謝流の違いが示唆された。また、全ジテルペン含有量は成木よりも苗木に少なかった (Table 2, 4)。特にグイマツでは、labdane 型ジテルペンが苗木よりも成木で顕著に多く、成長につれて labdane 型ジテルペンの生合成が増加することが示唆された。

Pinus pinaster では、オレオレジンに含まれる中性ジテルペンと樹脂酸を基に、精英樹であるか否かを判別できることが示唆されている³⁵⁾。著者は2つの家系、樺岡 168×十勝 16 及び豊岡 111×十勝 35 の成木枝の樹皮の8種のジテルペンの含有量によって、両親種とそれらの F₁ について判別分析を行ったところ、誤判別率は0%であった (Fig. 8)。第1軸及び第2軸の寄与率はそれぞれ91.3%及び8.7%であり、相関係数は0.9848及び0.8680であった。最小の誤判別率 (0%) は larixol, isopimaric acid (いずれも $P < 0.001$, $\text{Prob} > F$) 及び abietic

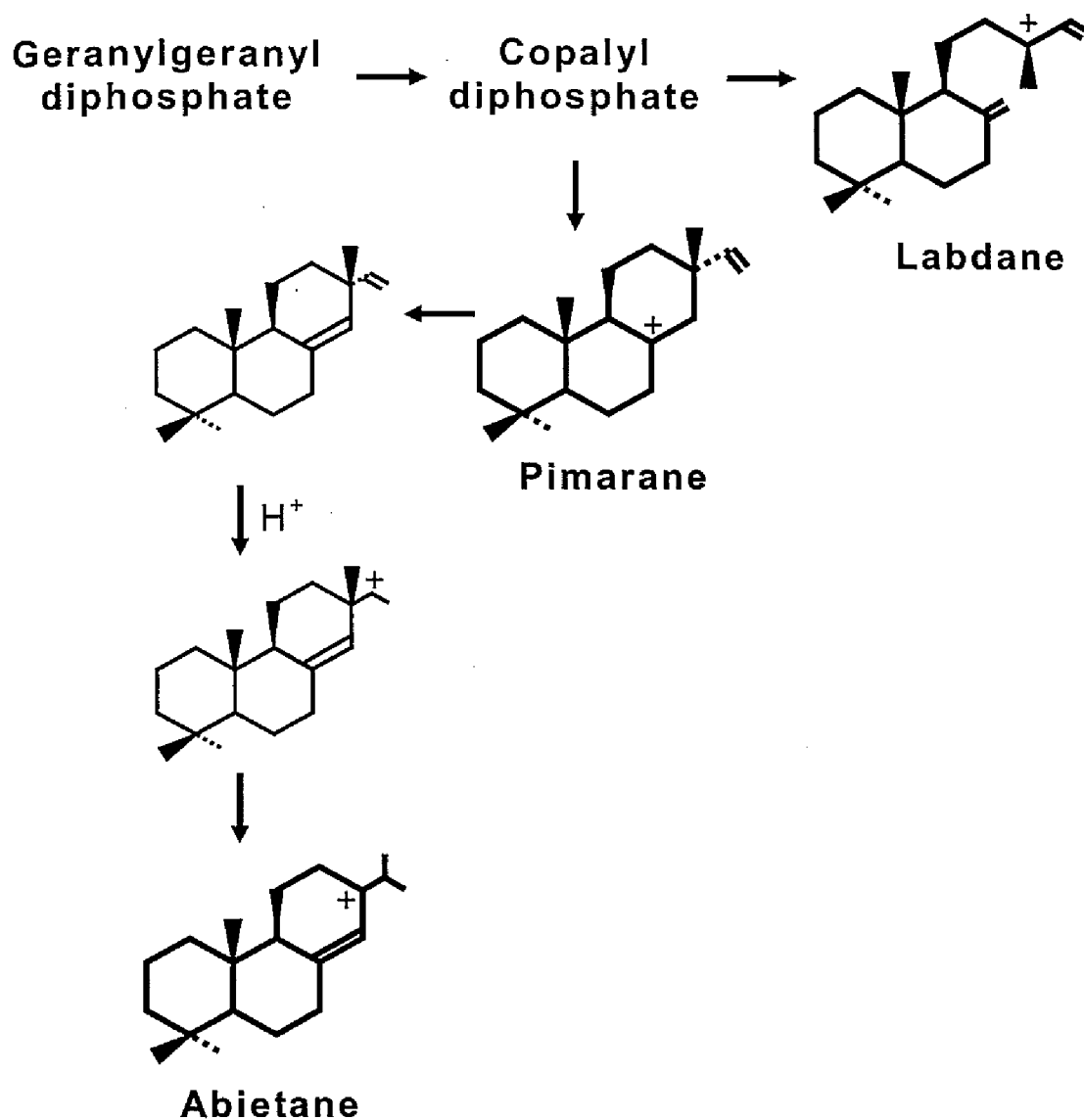


Fig. 15. Biogenesis of Three Structural Types of Diterpene in Plants. ⁴⁰⁾

acid ($P < 0.01$, $\text{Prob} > F$) の 3 つのジテルペンを選択することにより得られた。第 1 軸は neoabietic acid、13-epimanol, isopimaric acid の寄与率が高く、第 2 軸は isopimaric acid と abietic acid の寄与が高かった。

苗木について、家系別に行った判別では、成木と同様にグイマツと F_1 の判別が可能であった (Fig. 11)。最小の誤判別率を得るために必要なジテルペンは、13-epimanol, larixol, abietic acid (中標津 660, 中標津 121, 留辺蕊 26)、13-epimanol, abietic acid, isopimaric acid (樺岡 484, 留辺蕊 26)、larixol, isopimaric acid, abietic acid (樺岡 455) であった。いずれの家系の 3 種のジテルペンで判別が可能であったが、留辺蕊 26 にはさらに dehydroabietic acid と neoabietic acid が必要であった。

一般的に採種園では、種子に遺伝的多様性をもたせるため、両親それぞれについて数種のクローンを混植し、自然受粉により種子を得る。この研究で、複数の交配家系の苗木について枝樹皮のジテルペン組成を基に判別を行った場合の誤判別率は 7.7% であり、完全ではないが、ほぼ F_1 を判別することが可能であった (Fig. 12)。13-epimanol, abietic acid, isopimaric acid (いずれも $P < 0.001$, $\text{Prob} > F$) の 3 つのジテルペンを選択することによって、最小の誤判別率 (7.7%) が得られた。これらの結果、苗木の判別には、13-epimanol, larixol, abietic acid, isopimaric acid の含有量のデータが必要と考えられた。

このことから、グイマツ及びカラマツの複数のクローンが混植された採種園で得られた種子に由来する苗木であっても、それらの樹皮のジテルペン含有量により F_1 を判別できることが示唆された。

成木の葉のジテルペンの labdane/(pimarane+abietane) 比はグイマツ $> F_1 >$ カラマツとなり、樹皮と同様の傾向が認められた。成木の葉のジテルペン含有量によるグイマツ、カラマツ及び F_1 の誤判別率は 7.4% (Fig. 9)、グイマツと

F₁の誤判別率は0%であり (Fig. 10)、F₁を判別することが可能であった。しかし、苗木の葉では labdane/(pimarane+abietane) 比及び abietane/pimarane 比には樹種間に有意な差がなく (Table 9)、家系別の樹種誤判別率は13.5~28.6% (Fig. 13)、5家系のグイマツ (127 個体) 及び F₁ (82 個体) の樹種誤判別率は35.4%と高くなった (Fig. 14)。このことから、判別に使用する部位は葉よりも樹皮が適していると考えられた。

Mills は、*L. decidua* (larixol と larixyl acetate を含有するが、epitorulosol と epitorulosyl acetate を含有しない) と *L. kaempferi* (larixol と larixyl acetate を含有しないが、epitorulosol と epitorulosyl acetate を含有する) の雑種である *L. Xeurolepis* Henry (*L. decidua* × *L. kaempferi*) のオレオレジンの組成は、それらの両親の間であり、epitorulosol、larixol 及びそれらのアセテートをとともに含有することを報告している⁵⁵⁾。今回の研究は、F₁の larixol の割合は母樹であるグイマツに、abietic acid のそれは花粉親であるカラマツの影響を受けていることを示しており (Table 2)、Mills の報告⁵⁵⁾と同様、F₁のジテルペン組成は遺伝的に両親の影響を受けることを示唆していた。Gallis らは、*Pinas brutia* × *P. halepensis* とその両親のモノ及びセスキテルペンには質的な違いはないが、量的な違いが認められ、ほとんどのテルペン含有量は両親の間であることを報告している³⁶⁾。また、グイマツ雑種 F₁ は、苗高において雑種強勢を示すが、他のフェノロジー特性⁵⁶⁾や耐そ性^{16, 28)}は両親の中間の性質を示すことが報告されており、今回の研究結果からジテルペン含有量についても同様であると考えられた。

林らはエーテル抽出物量と野そ害に対する生存率には高い相関があり、樹皮のエーテル含有量は、耐そ性の指標になることを指摘している²⁸⁾。助野らはジテルペン、特に larixol と 13-epimanol に耐そ性があることを報告している³⁰⁾。

今回の結果でも、これら labdane 型ジテルペンの含有量はグイマツ>F₁>カラマツの順に多く (Table 2)、耐そ性との関連が示唆された。さらに、F₁ の larixol 含有量は家系内でも個体差が大きく (豊岡 111×十勝 35, 11.9~46.5%; 樺岡 168×十勝 16, 4.7~23.8%), labdane 型ジテルペンの含有量によって、より耐そ性の高い個体を選抜できる可能性がある。

要約

2家系の F₁人工交配家系、グイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg.) × カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) (以下 F₁) とそれらの両親のクローンの枝樹皮のジテルペン組成を分析した。ジテルペンとして 13-epimanol, larixol, larixyl acetate, 13-epitorulosyl acetate (グイマツでは検出されていない)、isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid 及び neoabietic acid が認められた。グイマツでは larixol が、カラマツでは abietic acid がそれぞれ 50% 以上を占めた。2家系の F₁ ではそれぞれ larixol または abietic acid が最も多かったが、それらの割合は両親であるグイマツとカラマツの中間の値であった。このように樹皮のジテルペン含有量は遺伝的に両親の影響を受けていた。ジテルペン組成から算出した labdane/(pimarane+abietane) 比及び abietane/pimarane 比の値から、グイマツでは copalyl diphosphate (CDP) から labdane 型ジテルペンへの、カラマツでは CDP から pimarane 及び abietane への合成経路が主であることが示唆された。

グイマツ、カラマツ及び F₁ の成木の 8 種のジテルペンの含有量を基に線形判別分析を行った結果、誤判別なく 3 樹種の判別が可能であることが示された。さらに、5 家系のグイマツ及び F₁ の苗木について枝の樹皮のジテルペン含有量を同様に解析したところ、誤判別率は 7.7% であり、複数の家系の苗木についても、ジテルペン含有量によってほぼ F₁ を判別できた。このことから、苗木枝の樹皮のジテルペン組成は、樹種判定をする上で有効な指標であると考えられる。

Ⅲ. グイマツ雑種 F₁人工交配家系における葉の脂肪酸組成の特徴並びにそれらによる樹種判別

植物では、プラスチド内で合成された脂肪酸（主としてパルミチン酸 (16:0) とオレイン酸 (18:1)) を材料として原核型経路と真核型経路によって様々なグリセロ脂質クラスが合成され、その後、脂肪酸不飽和化酵素の作用を受けて多価不飽和脂肪酸含有型脂質群に変換される⁵⁷⁻⁵⁹⁾。また、一部の脂肪酸は、小胞体内で鎖長延長され、ワックスやスフィンゴ脂質の構成脂肪酸として利用される⁶⁰⁾。これまで多くの植物について葉や種子の脂肪酸成分が分析され、その組成上の特徴と植物の系統樹との関連性が明らかになるとともに化学分類学上の指標の一つとして有用であることが提唱されている^{61, 62)}。針葉樹については、先に Mongrand らが 14 属 137 種の光合成組織 (葉) の脂肪酸分析値をベースに多変量解析を行って 4 群に分類できることを報告している⁶²⁾。同時に彼らは、主成分分析と判別分析及び階層型クラスター解析から、*Pinaceae* についてはさらに幾つかに区分できることを記述している。これらのことは、植物葉での脂質生合成系において脂肪酸組成の決定に係わる脂肪酸転移酵素の選択性や脂肪酸不飽和化酵素などの活性が遺伝的特性によって制御されていることに起因するものであろう。

第Ⅱ章では、グイマツ、カラムツ及び F₁ の成木とグイマツ及び F₁ の苗木の樹皮のジテルペン含有量を明らかにし、それらを基にした線形判別分析により樹種の判別が可能であることを明らかにした。5 家系の苗木の樹種誤判別率は、樹皮では 7.7% と低く雑種判別に有効であることが示されたが、葉では誤判別率が 35.4% と高く、葉はジテルペンによる樹種の判別には適していないと考えられる。しかし、葉による樹種の判別が可能であれば苗木本体を傷つけることなく、判

別作業が容易になると考えられる。そこで、第三章では成木と苗木の葉の脂肪酸成分を基にした樹種の判別を試みた³⁸⁾。同時に本研究では、樹種間での脂肪酸組成上の特徴が、主要な葉緑体脂質であるグリセロ糖脂質群、あるいは小胞体で合成される（いわゆる真核型経路により生成する）中性タイプのリン脂質群のどちらに起因するのかを検討し、葉緑体と小胞体での脂質合成系とそれに引き続いて起こる脂肪酸不飽和化反応における基質特性や活性の視点から考察した³⁸⁾。

実験方法

1. 材料

成木の試料採取は、2005年9月に北海道立林業試験場（北海道美唄市；43°28'N, 141°88'E）で行った。分析に供した成木の葉は、32年生グイマツクローン（豊岡 111, 4 ラメット；樺岡 168, 2 ラメット）及び46年生カラマツクローン（十勝 35, 5 ラメット；十勝 16, 5 ラメット）、並びにグイマツ×カラマツの11年生F₁雑種2家系（豊岡 111×十勝 35, 6 個体；樺岡 168×十勝 16, 4 個体）の枝から採取した。また、2006年9月にも同様に試料を採取した。

一方、実生の試料には、グイマツとカラマツがランダムに混植された雑種採種園（北海道有林網走東部森づくりセンター）で生産された種子を用いた。試料採取当時の樹高は、グイマツが約18 m、カラマツが約16 mであった。2004年8月に雑種採種園のグイマツから自然交配種子を採取し、得られた種子を2005年5月に林業試験場苗畑にて母樹別に播種した。なお、雑種採種園産種苗には雑種個体と純粋なグイマツ個体が混在しているが、これらはDNAマーカーによって苗木識別が行われた²³⁾。分析に使用した実生苗は、3母樹（中標津 121, 樺

岡 484, 留辺菘 28) 由来の 1 母樹あたりグイマツ 5 個体、雑種 5 個体で、2006 年 9 月に採取した。採取した枝は直ちに凍結保存し、葉を分析に使用した。

2. 全脂質の抽出と分画

採取した葉をホモジナイザー ((株)日本精機製作所製) により液体窒素中で粉碎した。15 μ g の BHT を含む 2 ml のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を葉粉碎物 150 mg に加え、10~15°C で 1 時間超音波抽出した。抽出物を遠心分離し、上清を採取した。抽出は 4 回行い、合わせた上清を Folch ら⁶³⁾ の分配割合で水洗し、得られた水洗下層を濃縮乾固して全脂質とした。

全脂質を Sep-Pak シリカカートリッジ (Waters Corp. 製) に供し、クロロホルム、アセトン及びメタノールで順に溶出し、中性脂質画分、糖脂質 (GL) 画分、リン脂質画分に分画した。リン脂質画分はさらに TOYOPAK DEAE M 試料前処理カートリッジ (東ソー (株) 製, 東京) に供した。クロロホルム-メタノール (2:1, v/v)、メタノール、クロロホルム-メタノール-1 M 酢酸アンモニウム (20:80:1, v/v/v)、各 10 ml で順次、溶出し、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 及びメタノール画分を合せて中性リン脂質 (PL) 画分とした。

3. ケイ酸 TLC

GL 画分と PL 画分をクロロホルム-アセトン-メタノール-酢酸-水 (10:4:2:2:1, v/v/v/v/v) によるケイ酸 TLC に供して脂質クラスの確認を行った。TLC プレートにはメルク社製のシリカゲル 60 (厚さ 250 μ m) を用いて、発色にはアンスロン-硫酸試薬あるいは Dittmer 試薬を使用した。

4. 脂肪酸の分析

全脂質、GL 画分及び PL 画分のそれぞれにメタノール性 5%塩化水素 2 ml を加え、2 時間、100℃でメタノリシスした。反応終了後、1 ml の蒸留水を添加し、ヘキサン 2 ml で脂肪酸メチルエステルを 3 回抽出し、抽出物を 1 回水洗した。ヘキサン層を減圧濃縮後、脂肪酸メチルエステルを GC-MS (島津 QP-2010, (株) 島津製作所製) に供した。カラムには ULBON-HR-1 (50 m × 0.25 mm i.d., GL Science 社製) を用い、カラム温度は 80℃から 180℃までは 15℃/min、180℃から 320℃までは 2℃/min でそれぞれ昇温し、その後、14 分間保持した。ヘリウムをキャリアガスとし、注入口温度は 240℃、イオン化電圧は 70 eV とした。また、GC 分析には水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-14A, (株) 島津製作所製) を用い、DB-1MS (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm; Agilent 社製) で分析した。カラムは 80℃から 180℃までは 15℃/min、180℃から 230℃までは 2℃/min、230℃から 290℃までは 4℃/min でそれぞれ昇温した後、23 分間保持した。ヘリウムをキャリアガスとし、注入口と検出器温度はそれぞれ 290℃とした。GC 分析は 3 回行い、ピーク面積から脂肪酸組成を算出し、平均値と標準偏差を示した。

5. 統計解析

グイマツ、カラマツ及び F₁ 間の脂肪酸組成の多重比較は Tukey-Kramer の HSD 検定 ($P < 0.05$) により行った。また、雑種判別の有効性を検証するため、線形判別分析を行った。以上の統計解析には JMP 5.0.1J (SAS Institute Inc. 製) を使用した。脂肪酸組成による主成分分析は Excel statistics 2002 for Windows ((株) 社会情報サービス製) を用いて行った。

実験結果

1. 成木の葉の全脂質における脂肪酸組成

2005年に採取したグイマツクローン（豊岡 111, 4 ラメット; 樺岡 168, 2 ラメット）、カラムツクローン（十勝 35, 5 ラメット; 十勝 16, 5 ラメット）と2家系のF₁（豊岡 111 家系, 6 個体; 樺岡 168 家系, 4 個体）の葉全脂質の脂肪酸組成を分析したところ、いずれの試料でもC₁₂からC₃₂までの21種の脂肪酸が認められた（Fig. 16 及び Table 10）。それら脂肪酸の中ではリノレン酸（18:3）が共通して最も多く、次に16:0が多く、また、裸子植物に特徴的な14-メチルパルミチン酸（br-17:0）も微量ながら検出された^{62, 64}。リノール酸（18:2）の割合（6.6%～8.4%）には3樹種でほとんど差がなかったが、18:1の割合は3.8%～7.6%の間で、グイマツ、F₁、カラムツの順に多く含まれ、グイマツとF₁の間には有意差が認められた（Tukey-Kramer HSD test, $P < 0.05$ ）。18:3は、グイマツ（32.3%と32.7%）に少なく、カラムツ（40.6%と34.2%）に多い傾向が認められた。

18:2と18:3の合計値に対する18:1の比（18:1/18:2&18:3）を算出すると、グイマツ（0.18と0.19）よりもカラムツ（0.08と0.10）で低かった。F₁では2家系とも18:1/18:2&18:3比は両親であるグイマツとカラムツの中間の値（0.11と0.13）を示し、グイマツとF₁の間には有意差（Tukey-Kramer HSD test, $P < 0.05$ ）が認められた。C₁₆の脂肪酸の合計とC₁₈の脂肪酸の合計の比（ $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ ）は、樺岡 168 家系（1.47～1.66）では樹種間に違いが認められなかったものの、豊岡 111 家系ではC₁₆はグイマツがカラムツより多く、C₁₈はカラムツがグイマツよりも多く、2樹種間で有意差（Tukey-Kramer HSD test, $P < 0.05$ ）が認められた。F₁の $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比の値は、両親であるグイマツとカラムツの中

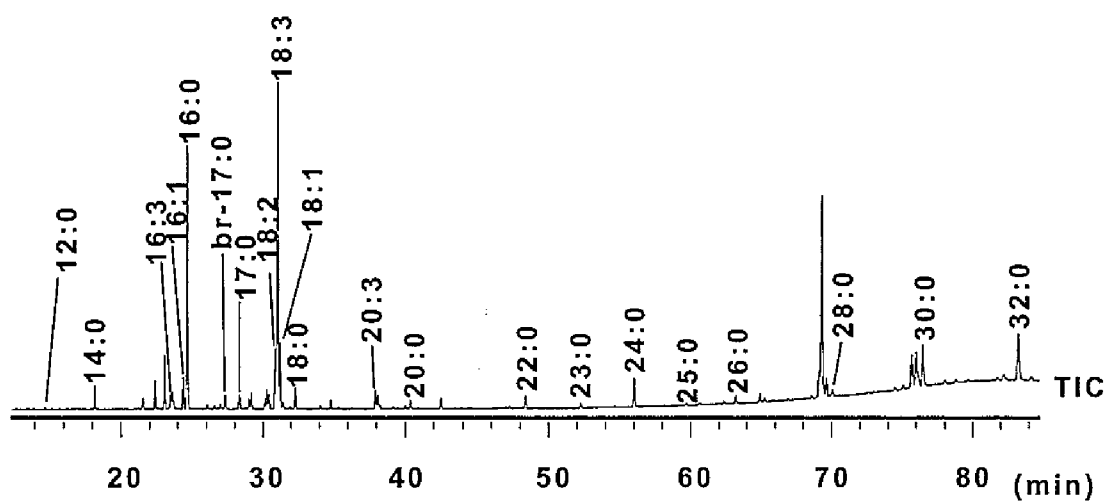


Fig. 16. Total Ion Chromatogram of Fatty Acid Methyl Esters from Hybrid F₁ Leaves (Toyooka 111 × Tokachi 35) Determined by GC-MS.

Table 10. Fatty Acid Composition (mol%) of Total Lipids in *L. gmelinii* var. *japonica*, *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* F₁ Hybrids, and *L. kaempferi* Leaves

Fatty acid	Toyooka 111 family			Kabaoka 168 family		
	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,d}	<i>L. kaempferi</i> ^e	<i>L. gmelinii</i> ^{a,f}	F ₁ ^{b,c}	<i>L. kaempferi</i> ^e
12:0	0.9±0.1	0.7±0.4	1.5±0.6	1.1±0.1	2.3±1.6	1.9±1.0
14:0	4.0±1.2	3.5±0.4	3.7±0.2	5.9±0.3	2.8±0.7	3.3±0.7
16:0	25.7±1.7	23.9±1.5	21.2±1.1	21.5±0.4	24.5±1.7	23.5±0.7
16:1	4.1±0.3	4.3±0.3	4.5±0.2	5.2±0.3	4.7±0.5	4.5±0.2
16:3	2.4±0.2	2.8±0.2	3.3±0.2	2.8±0.1	2.6±0.3	3.0±0.3
br-17:0	1.3±0.2	1.3±0.2	1.0±0.1	1.0±0.1	1.6±0.2	1.4±0.1
17:0	1.7±0.1	1.4±0.1	1.3±0.3	1.5±0.0	1.6±0.1	1.4±0.1
18:0	2.2±0.1	1.9±0.1	1.7±0.1	1.5±0.0	1.8±0.1	2.0±0.1
18:1	7.1±1.0	5.0±0.6	3.8±0.2	7.6±0.7	5.1±0.4	4.3±0.5
18:2	6.7±0.2	6.6±0.7	6.6±0.8	7.0±0.1	7.5±0.8	8.4±0.6
18:3	32.3±3.5	38.1±2.2	40.6±2.6	32.7±1.1	32.2±3.6	34.2±1.4
20:0	0.5±0.2	0.7±0.2	1.7±0.2	1.2±0.0	1.5±0.4	2.4±0.5
20:3	2.1±0.0	1.9±0.1	2.0±0.1	2.4±0.0	1.8±0.1	1.7±0.1
22:0	0.7±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1	1.1±0.0	0.9±0.1	0.7±0.1
23:0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
24:0	2.3±0.2	1.3±0.2	0.9±0.1	1.7±0.0	1.5±0.3	1.1±0.1
25:0	0.4±0.1	0.3±0.1	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.0
26:0	0.9±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.6±0.0	0.6±0.1	0.6±0.1
28:0	0.6±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.5±0.0	0.6±0.1	0.7±0.2
30:0	1.8±0.2	1.8±0.2	2.0±0.2	2.2±0.1	2.4±0.2	1.9±0.1
32:0	2.0±0.1	2.4±0.4	2.3±0.2	2.1±0.1	3.5±0.5	2.5±0.2
18:1/18:2&18:3	0.18±0.04 ^A	0.11±0.02 ^B	0.08±0.01 ^B	0.19±0.02 ^A	0.13±0.02 ^B	0.10±0.01 ^B
ΣC ₁₈ /ΣC ₁₆	1.50±0.17 ^B	1.66±0.13 ^{AB}	1.82±0.12 ^A	1.66±0.05 ^A	1.47±0.19 ^A	1.57±0.05 ^A

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Means ± S.D (^c n = 4, ^d n = 6, ^e n = 5, ^f n = 2).

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test (*P*<0.05).

間であった。

年度による脂肪酸組成の違いを検討するために、翌年（2006年）の9月に採取した豊岡 111×十勝 35 家系について比較分析したところ（Table 11）、グイマツ、カラマツ及び F₁ 各 1 個体の 2005 年 9 月と 2006 年 9 月の脂肪酸組成には年度による違いは実質的に認められなかった。また、 $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比と 18:1/18:2&18:3 比の値も同様の傾向であった。

2. 成木の脂肪酸組成による主成分分析と線形判別分析

各樹種の全個体の脂肪酸分析データを主成分分析した結果を Fig. 17 に示す。全体の分散の 75.4% を説明する第一主成分と、10.1% を説明する第二主成分が抽出された。これらの主成分得点をプロットすると、2 家系の 3 樹種プロットは各樹種別のクラスターに分類することができ、グイマツ、F₁、カラマツの各クラスターは第 2 象限から第 4 象限の方向に位置し、特に 3 群は第二主成分によって区別できることが判明した（Fig. 17A）。また、第二主成分に対する各脂肪酸組成比の因子負荷量を算出すると、正の相関が高いのは 18:1 で、負の相関が高いのはアラキジン酸（20:0）であり、これらの脂肪酸の割合によってグイマツ、カラマツ及び F₁ の 3 群の葉は特徴付けられるものと推測された（Fig. 17B）。

次いで、葉全脂質の脂肪酸組成の分析結果の中から C₁₂ から C₂₂ までの 14 種の脂肪酸含有率を使用してグイマツと F₁ の線形判別分析を行ったところ（Fig. 18A）、多変量平均の 95% 信頼区間を示す図中の円は両樹種間で離れて有意な差が認められた。この場合、誤判別率は 0% であったことから、成木の葉の脂肪酸組成をこの手法で統計分析することによって両樹種の判別ができることが示された。第 1 軸の相関係数は 0.9845 であった。P 値がもっとも小さい脂肪酸は、18:1、イコサトリエン酸（20:3）（ $P < 0.001$, Prob > F）、ミリスチン酸（14:0）及び

Table 11. The Comparison of Fatty Acid Composition (mol%) of Total Lipids in *L. gmelinii* var. *japonica*, *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* F₁ Hybrids, and *L. kaempferi* Leaves by Year

Fatty acid	September 2005			September 2006		
	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. kaempferi</i>	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. kaempferi</i>
12:0	0.8±0.1	0.6±0.2	1.6±0.1	1.1±0.2	1.9±0.1	2.2±0.2
14:0	5.7±0.3	2.9±0.3	3.7±0.0	3.7±0.1	4.0±0.1	2.6±0.1
16:0	25.8±0.0	26.1±0.2	20.7±0.1	27.3±0.2	25.4±0.2	21.5±0.2
16:1	4.4±0.0	4.3±0.0	4.2±0.0	4.4±0.1	4.3±0.0	4.0±0.0
16:3	2.3±0.0	2.5±0.0	3.4±0.1	1.6±0.0	2.0±0.0	2.3±0.0
br-17:0	1.1±0.0	1.5±0.1	1.0±0.1	1.4±0.0	1.5±0.0	1.3±0.1
17:0	1.7±0.4	1.6±0.1	1.1±0.2	2.2±0.0	1.9±0.0	1.6±0.0
18:0	2.2±0.0	1.9±0.0	1.7±0.1	2.6±0.0	2.2±0.0	2.3±0.0
18:1	6.8±0.0	5.4±0.1	3.7±0.0	7.6±0.0	6.3±0.1	4.0±0.1
18:2	6.8±0.1	6.2±0.0	7.1±0.2	8.9±0.2	7.7±0.2	8.7±0.4
18:3	30.7±0.3	35.9±0.2	40.9±0.1	28.6±0.1	34.1±0.1	38.9±0.7
20:0	0.5±0.1	0.5±0.0	1.5±0.1	0.6±0.0	0.6±0.0	1.2±0.0
20:3	2.0±0.0	1.9±0.0	2.0±0.0	2.7±0.0	2.2±0.1	2.9±0.0
22:0	0.8±0.3	0.6±0.0	0.6±0.2	0.9±0.0	0.8±0.0	1.3±0.0
23:0	0.4±0.0	0.3±0.1	0.2±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
24:0	2.3±0.1	1.3±0.1	0.9±0.1	1.8±0.1	0.9±0.0	0.8±0.0
25:0	0.5±0.3	0.4±0.0	0.2±0.0	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.0
26:0	0.9±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.7±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
28:0	0.5±0.1	0.8±0.2	0.7±0.2	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.1
30:0	1.7±0.0	2.1±0.0	2.1±0.1	1.4±0.1	1.2±0.1	1.4±0.2
32:0	1.9±0.0	2.9±0.0	2.2±0.0	1.5±0.1	1.6±0.0	1.6±0.1
18:1/18:2&18:3	0.18±0.00 ^A	0.13±0.00 ^B	0.08±0.00 ^C	0.20±0.00 ^A	0.15±0.00 ^B	0.08±0.00 ^C
ΣC ₁₈ /ΣC ₁₆	1.43±0.01 ^C	1.50±0.00 ^B	1.89±0.01 ^A	1.43±0.01 ^C	1.58±0.01 ^B	1.94±0.03 ^A

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Data show the means ± S.D of three independent experiments.

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

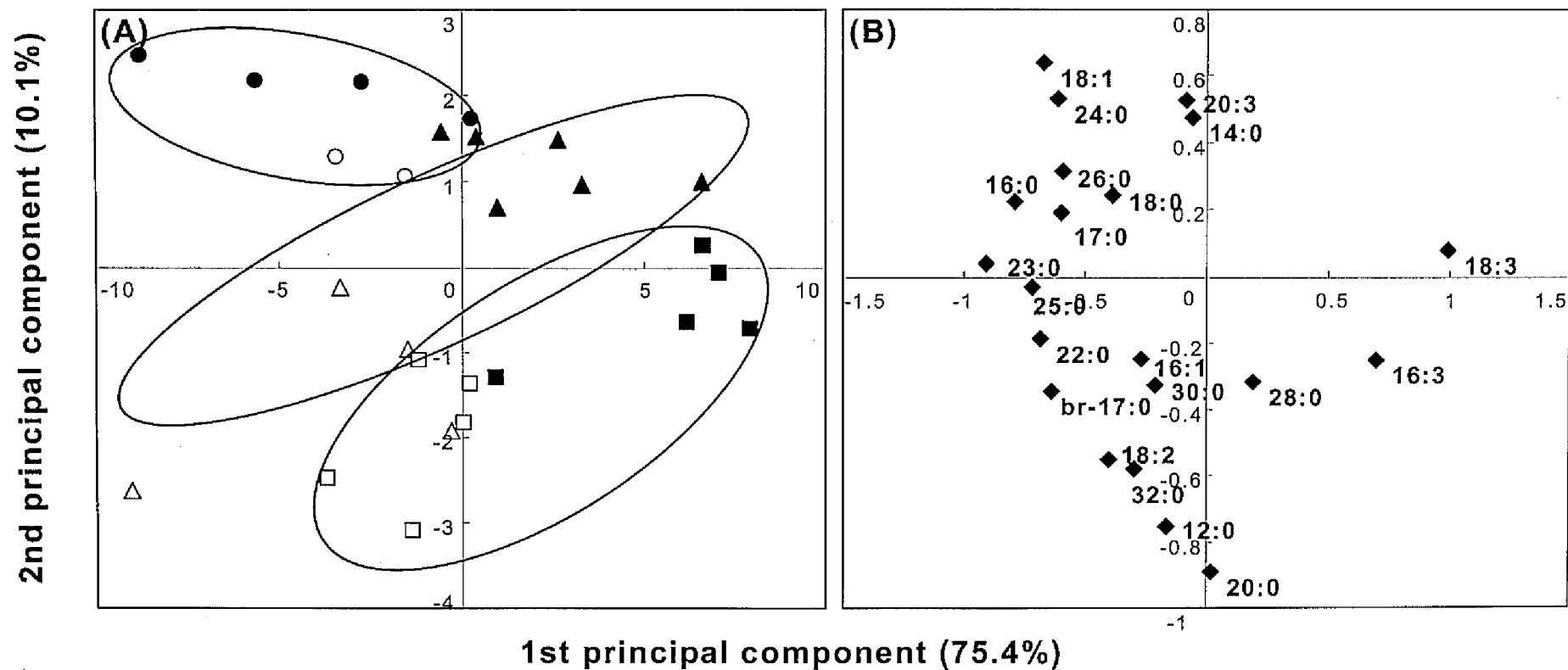


Fig. 17. Scatter Gram (A) and Factor Loadings (B) of Fatty Acid Compositions in the Leaves of *L. gmelinii* var. *japonica* (○, ●), *L. kaempferi* (□, ■), and F₁ Hybrid (△, ▲) Adult Trees for the First and Second Principal Components.

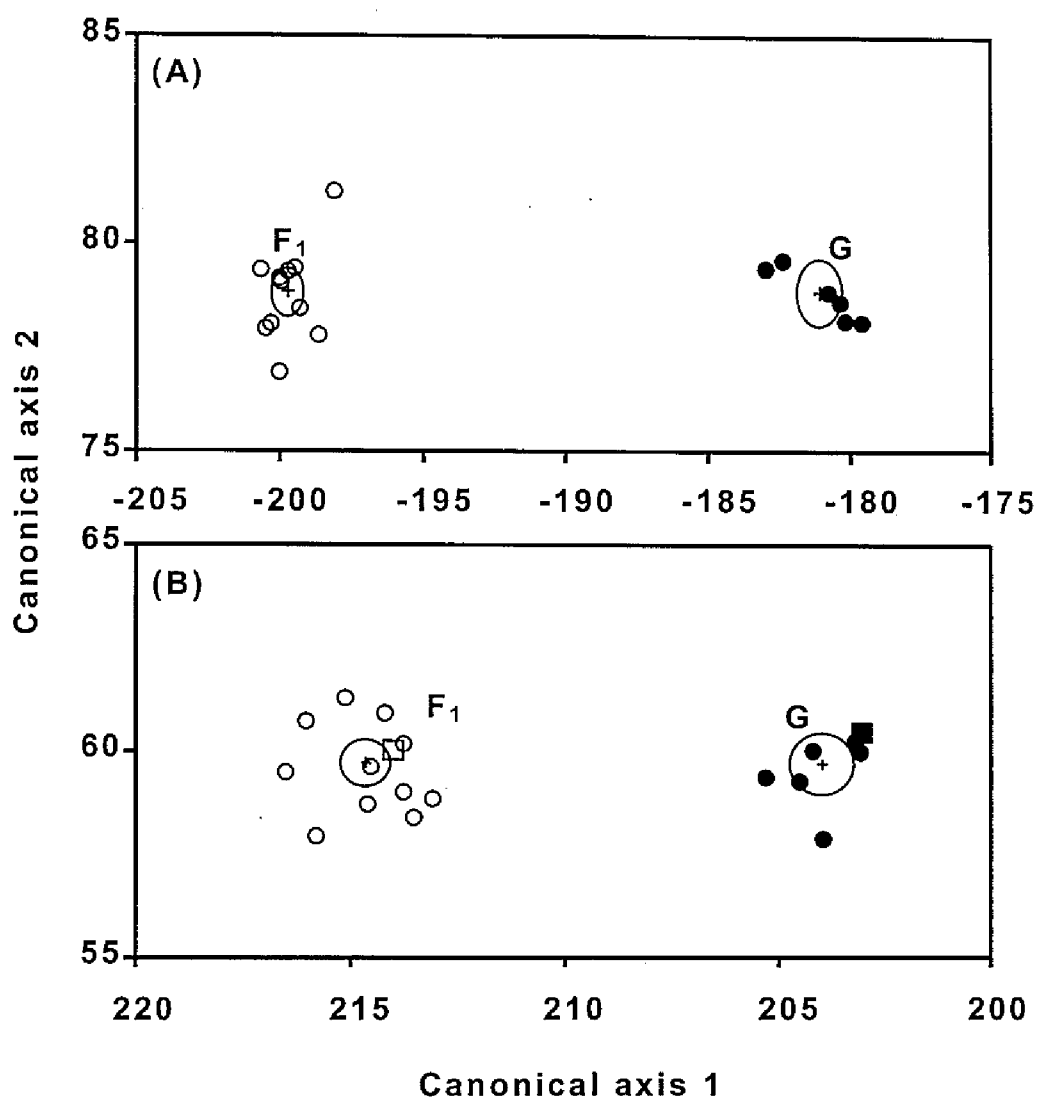


Fig. 18. Linear Discriminant Analysis Using Fatty Acid Compositions (from C₁₂ to C₂₂) of the Leaves of *L. gmelinii* var. *japonica* (●, ■) and the F₁ Hybrid (○, □) Adult Trees from Two Families.

● and ○ indicate samples collected in 2005, and ■ and □ indicate samples collected in 2006, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

br-17:0 ($P < 0.05$, $\text{Prob} > F$) であった。特に、18:1 はどの脂肪酸との組み合わせにおいても誤判別が少なく、18:1 を判別に使用した場合の誤判別は 26 個体のうち、最大 3 個体であった。18:1 は 2 家系ともに F_1 よりもグイマツに多く (Table 10)、線形判別分析においてはこの差によって判別が可能であると考えられた。なお、2005 年 9 月の分析データに 2006 年 9 月のデータを加えてプロットした場合もグイマツと F_1 の判別が可能であったことから、年度の違いは判別には影響を与えないことが示唆された (Fig. 18B)。また、グイマツ、カラムツ、 F_1 の 3 樹種についても誤判別なく樹種を判別することが可能であった (Fig. 19)。

3. 糖脂質画分と中性リン脂質画分の主要脂質クラスとその脂肪酸組成

豊岡 111×十勝 35 家系のグイマツ、カラムツ及び F_1 の各 1 個体から調製した GL 画分と PL 画分を TLC で分析したところ、いずれも主要な脂質クラスは、前者では DGDG と MGDG で、後者では PC と PE であった (Fig. 20)。

PL 画分の構成脂肪酸を分析すると (Table 12)、18:1/18:2&18:3 比はグイマツ、 F_1 、カラムツの順に有意に小さかった。一方、GL 画分では、18:1 や 18:2 と比べて 18:3 の割合が圧倒的に高いこともあり、18:1/18:2&18:3 比には樹種間に有意差が認められなかった (Table 12)。また、18:3 の割合にも 3 樹種間での有意な違いは観察されなかった。

GL 画分の構成脂肪酸における樹種間での特徴としては、16:0 の割合がグイマツ、 F_1 、カラムツの順に多く、18:3 のそれはその逆にカラムツ、 F_1 、グイマツの順に多かった。このことから、 $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比は 3 樹種間で大きく異なっていた。なお、PL 画分においても 3 樹種間での $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比の違いは軽微であったが、有意な差が観察された。

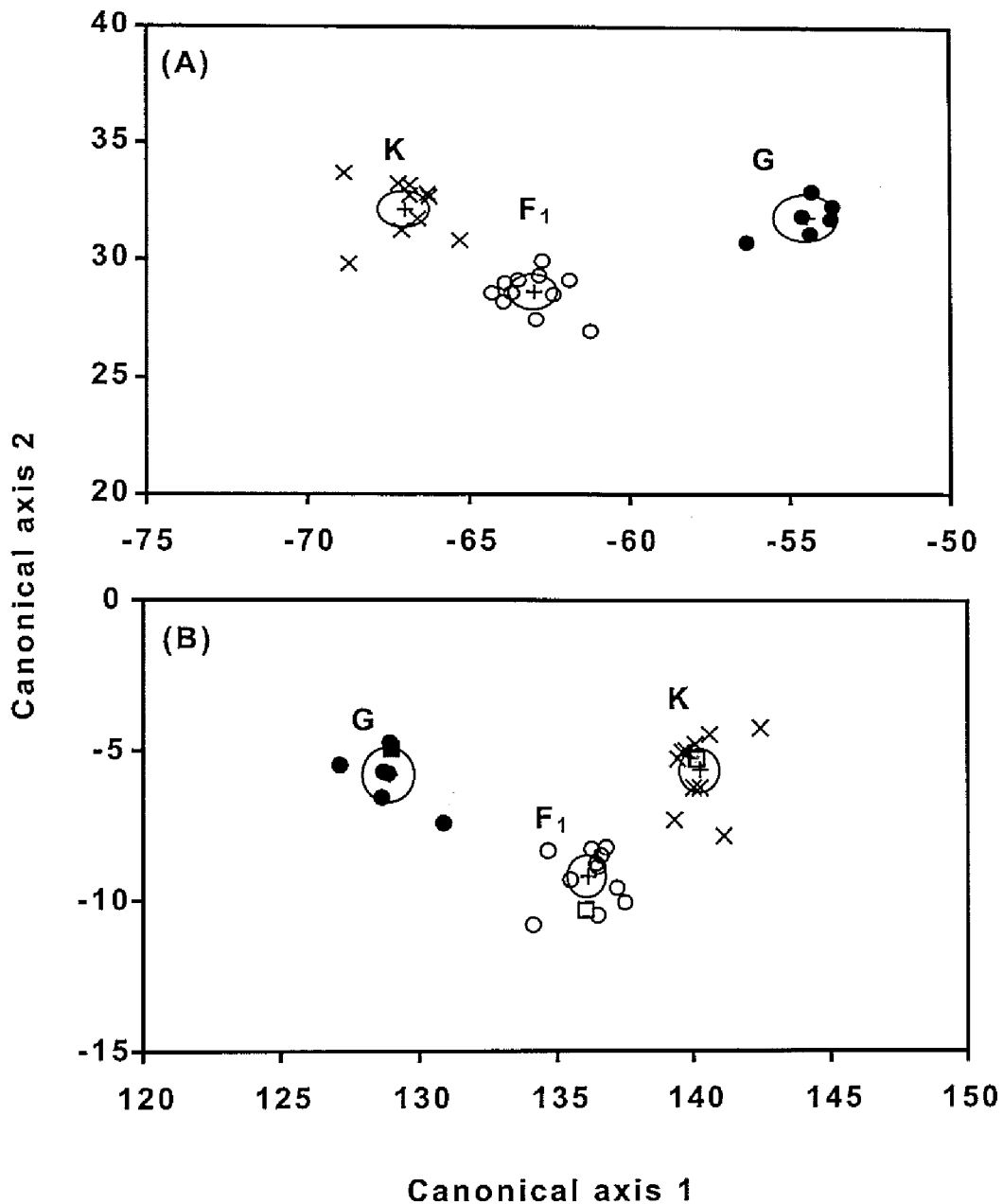


Fig. 19. Linear Discriminant Analysis Using Fatty Acid Compositions (from C₁₂ to C₂₂) of the Leaves of *L. gmelinii* var. *japonica* (●, ■), *L. kaempferi* (×, □) and the F₁ Hybrid (○, □) Adult Trees from Two Families.

●, ○ and × indicate samples collected in 2005, and ■, □ and ■ indicate samples collected in 2006, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

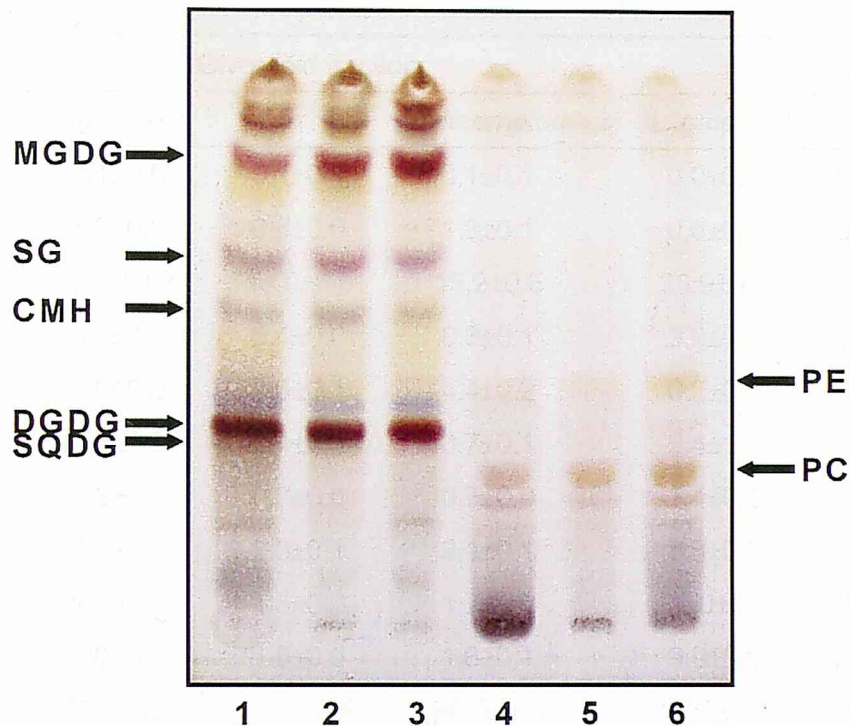


Fig. 20. Thin-Layer Chromatogram of Glycolipid (Lane 1-3) and Neutral Phospholipid (Lane 4-6) Fractions from Adult Trees of *L. gmelinii* var. *japonica* (Lane 1 and 4), the F₁ Hybrid (Lane 2 and 5), and *L. kaempferi* (Lane 3 and 6).

Solvent system, chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (10:4:2:2:1, v/v/v/v/v). Detection, 50% H₂SO₄.

Abbreviations: MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; SG, steryl glucoside; CMH, ceramide monohexoside; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; SQDG; sulfoquinovosyldiacylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine.

Table 12. Fatty Acid Composition (mol%) of Glycolipids and Neutral Phospholipids Fractions of *L. gmelinii* var. *japonica*, *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* F₁ Hybrids, and *L. kaempferi* Leaves

Fatty acid	Glycolipid fraction			Neutral phospholipid fraction		
	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. kaempferi</i>	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. kaempferi</i>
12:0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1	0.0±0.1	0.1±0.1	0.0±0.0
14:0	3.3±0.2	0.8±0.0	1.8±0.1	0.6±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0
16:0	21.9±0.2	18.0±0.6	15.2±0.5	38.9±0.4	38.6±0.2	34.2±0.5
16:1	0.6±0.1	0.4±0.0	0.3±0.1	3.9±0.0	1.5±0.0	5.2±0.1
16:3	4.0±0.2	3.6±0.1	4.4±0.2	0.2±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0
br-17:0	1.2±0.0	1.4±0.0	0.7±0.1	2.4±1.4	1.7±0.0	1.2±0.1
17:0	1.8±0.9	0.9±0.0	0.7±0.0	1.4±0.1	1.2±0.0	1.0±0.1
18:0	4.1±1.5	2.3±0.1	2.1±0.1	8.3±0.3	6.2±0.2	6.5±0.2
18:1	1.8±1.2	1.5±0.3	1.7±0.9	12.0±0.1	10.7±0.2	7.6±0.1
18:2	1.0±0.2	1.6±0.6	1.6±0.1	9.9±0.1	11.3±0.8	14.0±0.2
18:3	57.8±0.6	65.6±0.5	66.9±0.6	16.5±0.2	21.1±0.9	23.4±0.2
20:0	0.7±0.1	0.5±0.1	1.0±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1
20:3	0.8±0.5	0.6±0.1	0.1±0.0	3.1±0.9	4.7±0.4	3.9±0.8
22:0	0.1±0.0	0.5±0.1	0.3±0.0	0.4±0.1	0.6±0.2	0.4±0.1
23:0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.2	0.2±0.2	0.5±0.0	0.4±0.0
C ₂₄ -C ₃₂	0.7±0.4	2.1±0.7	2.8±0.5	1.8±0.0	1.1±0.1	1.3±0.1
18:1/18:2&18:3	0.03±0.02 ^A	0.02±0.00 ^A	0.02±0.01 ^A	0.45±0.01 ^A	0.33±0.01 ^B	0.20±0.00 ^C
ΣC ₁₈ /ΣC ₁₆	2.44±0.03 ^C	3.23±0.11 ^B	3.61±0.14 ^A	1.08±0.02 ^C	1.22±0.01 ^B	1.30±0.02 ^A

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Data show the means ± S.D of three independent experiments.

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test ($P < 0.05$).

4. 苗木と成木の葉の全脂質における脂肪酸組成の比較

3家系のグイマツ及びF₁の苗木の各5個体を用いて葉の全脂質の脂肪酸組成を分析した結果をTable 13に示す。主要な脂肪酸は同様に18:3と16:0であったが、成木と比較すると、苗木では16:0が16%~18%であり、成木(22%~26%, Table 10)より顕著に少なかった。一方、18:3は成木の32%~38%(Table 10)に対して、苗木では41%~45%と多かった。構成脂肪酸の $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比の値は、苗木では成木よりも高かった。また、グイマツとF₁の間での違いを見ると、18:1/18:2&18:3比には成木のような樹種間の差が認められなかった。

苗木の葉の脂肪酸組成には上述したように3樹種間での顕著な違いは観察されなかったため、主成分分析を行っても成木のように樹種ごとにクラスターを形成しなかった(Fig. 21)。しかし、含有率の少ないラウリン酸(12:0)を除いたC₁₄からC₂₂までの13種の脂肪酸含有率を使用してグイマツとF₁の線形判別分析による判別を行ったところ、苗木でも多変量平均の95%信頼区間を示す図中の円はグイマツとF₁の間で離れ、樹種間に有意な差が認められた(Fig. 22)。第1軸の相関係数は0.8369で、成木の場合よりもP値は高かったが、P値がもっとも小さい脂肪酸はbr-17:0($P<0.05$, Prob>F)と14:0($P<0.1$, Prob>F)であった。なお、上述したように苗木では脂肪酸含有率の樹種間の差が小さいことから、誤判別率は3.3%(1個体のみ誤判別)であった。

Table 13. Fatty Acid Composition (mol%) of Total Lipids in *L. gmelinii* var. *japonica* and *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* F₁ Hybrid Seedlings Leaves

Fatty acid	Nakashibetsu 121		Kabaoka 484		Rubeshibe 28	
	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b
12:0	0.9±0.6	1.2±1.3	0.1±0.2	1.4±1.3	0.2±0.3	0.4±0.6
14:0	3.2±1.1	2.2±0.5	2.9±0.4	2.5±0.5	4.5±0.9	3.7±1.3
16:0	17.2±2.1	16.0±1.4	17.8±1.7	17.7±1.5	17.7±2.0	16.9±1.2
16:1	4.6±0.4	4.7±0.3	5.0±0.2	5.6±0.3	5.4±0.6	5.3±0.6
16:3	2.7±0.4	3.0±0.3	2.8±0.4	2.8±0.1	3.1±0.2	3.1±0.6
br-17:0	1.0±0.5	1.1±0.2	0.8±0.1	1.5±0.3	0.8±0.2	0.9±0.2
17:0	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.0	0.8±0.1	0.7±0.1
18:0	1.5±0.4	1.5±0.1	1.6±0.2	1.5±0.3	1.6±0.3	1.7±0.1
18:1	6.2±1.0	6.3±0.5	6.0±0.6	6.1±0.6	6.0±1.5	5.9±1.1
18:2	7.7±1.5	8.1±0.9	8.1±0.9	8.2±1.4	8.0±0.9	8.5±1.0
18:3	43.1±7.6	45.4±3.1	44.3±3.8	42.4±5.0	40.7±4.3	40.7±3.1
20:0	4.7±1.6	3.8±0.3	4.0±1.0	3.5±0.9	4.9±1.0	5.9±1.2
20:3	1.1±0.2	1.2±0.2	1.3±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	1.3±0.1
22:0	0.9±0.4	0.7±0.3	0.6±0.0	0.6±0.1	0.5±0.1	0.5±0.2
23:0	0.3±0.2	0.2±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2±0.0
24:0	0.8±0.1	0.8±0.3	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1
25:0	0.2±0.1	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1
26:0	0.5±0.4	0.4±0.2	0.7±0.1	0.9±0.5	0.5±0.2	0.7±0.2
28:0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	0.1±0.1
30:0	0.8±0.2	0.7±0.2	0.6±0.1	0.6±0.2	0.8±0.2	0.7±0.2
32:0	1.6±0.5	1.6±0.5	1.6±0.2	1.4±0.2	1.7±0.2	1.9±0.3
18:1/18:2&18:3	0.12±0.04 ^A	0.12±0.01 ^A	0.11±0.02 ^A	0.12±0.02 ^A	0.12±0.04 ^A	0.12±0.03 ^A
ΣC ₁₈ /ΣC ₁₆	2.39±0.47 ^A	2.58±0.26 ^A	2.34±0.23 ^A	2.23±0.29 ^A	2.15±0.27 ^A	2.25±0.23 ^A

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Means ± S.D (n = 5).

Values not sharing the same superscript letters (A, B, C) within each family are significantly different by Tukey-Kramer HSD test (P<0.05).

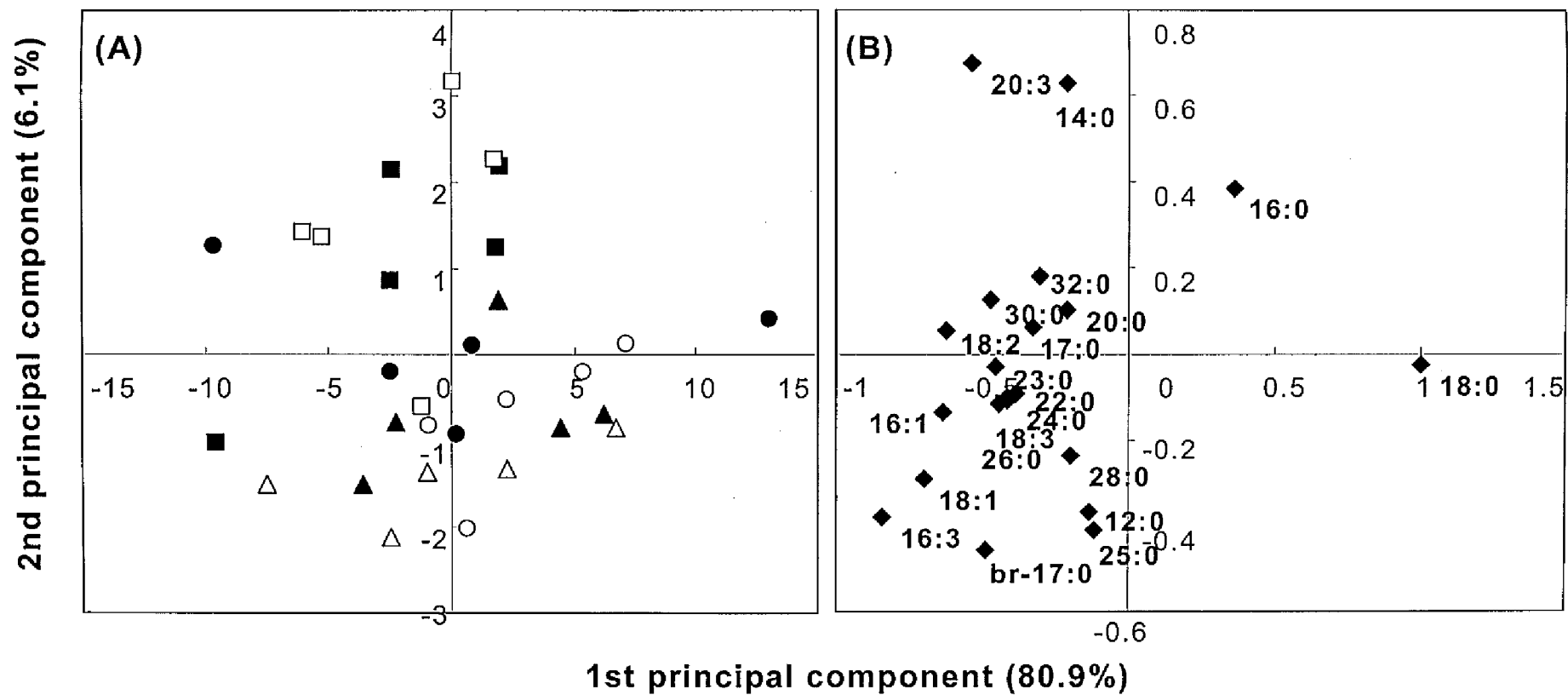


Fig. 21. Scatter Gram (A) and Factor Loadings (B) of Fatty Acid Compositions in the Leaves of *L. gmelinii* var. *japonica* (○, ●), *L. kaempferi* (□, ■), and F₁ Hybrid (△, ▲) Adult Trees for the First and Second Principal Components.

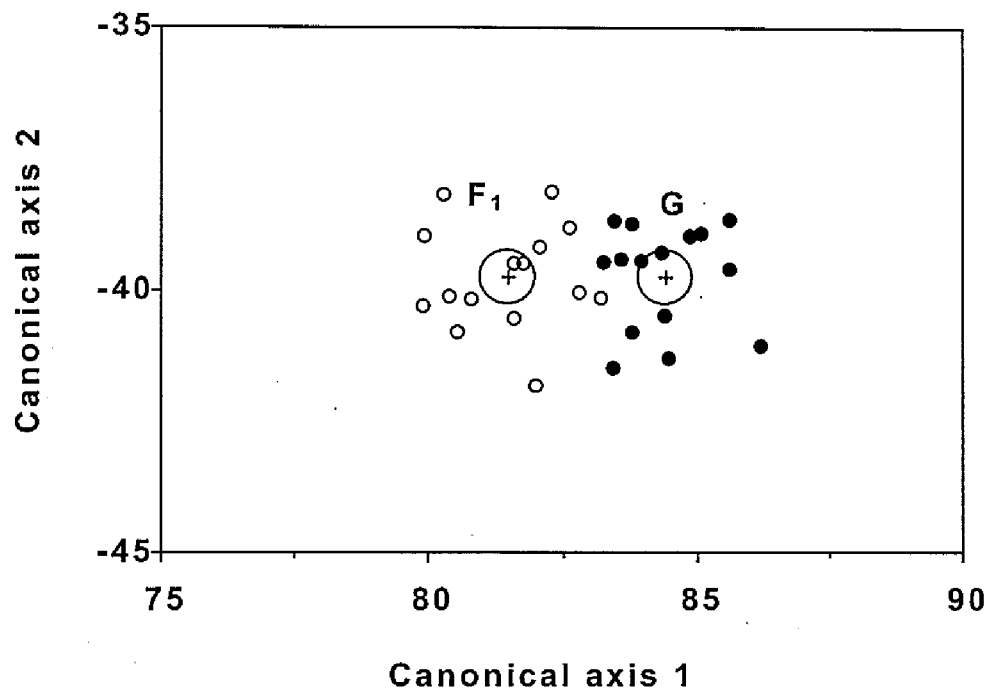


Fig. 22. Linear Discriminant Analysis Using Fatty Acid Compositions (from C₁₄ to C₂₂) of the Leaves of *L. gmelinii* var. *japonica* (●) and the F₁ Hybrid (○) Seedlings from Three Families.

The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

考察

グイマツクローン、カラマツクローンと 2 家系の F₁ の成木から採取した葉全脂質の脂肪酸組成を分析した結果 (Table 10)、18:3 はグイマツ (32.3%と 32.7%) に少なく、カラマツ (40.6%と 34.2%) に多い傾向が認められた。先に、Mongrand らは *L. gmelinii* (Rupr.) Kuzen と *L. kaempferi* (Lamb.) Carr. の葉全脂質の脂肪酸組成を報告しているが⁶²⁾、彼らが供試したグイマツとカラマツでは 18:3 の割合 (前者では 40.2%に対して後者では 34.4%) はグイマツの方が高かった。今回の 2 家系のカラマツでも 18:3 の割合が顕著に異なっていたことから判断すると、同じ樹種でも家系や亜種間で脂肪酸組成に特徴が見られることがあるのかもしれない。

18:1/18:2&18:3 比は、グイマツよりもカラマツで有意に低く、カラマツでは脂肪酸のポリ不飽和化がより進んでいることが示された。また、 $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比は、豊岡 111 家系においてカラマツがグイマツよりも有意に高かった。F₁ の 18:1/18:2&18:3 比は 2 家系とも両親であるグイマツとカラマツの中間の値を示し、 $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比は、豊岡 111 家系において両親であるグイマツとカラマツの中間の値を示した。また、これらの脂肪酸組成の特徴は年度が異なっても同様の傾向を示すことが明らかとなった (Table 11)。

各樹種の脂肪酸分析データを主成分分析した結果 (Fig. 17)、2 家系 3 樹種のプロットは各樹種別のクラスターに分類することができ (Fig. 17A)、グイマツ、カラマツ及び F₁ の 3 樹種は脂肪酸組成によって特徴づけられることが示された (Fig. 17B)。さらに、C₁₂ から C₂₂ までの 14 種の脂肪酸含有率を使用した線形判別分析により (Fig. 18A)、グイマツと F₁ を誤判別率なく判別できることが示された。判別に必要な脂肪酸としては、特に 18:1 ($P < 0.001$, Prob $> F$) が挙げられ

るが、18:1 は 2 家系ともに F₁ よりもグイマツに多く (Table 10)、主成分分析の第二主成分においてもっとも正の相関が高いことから (Fig. 17B)、3 樹種の特徴を示す脂肪酸であると考えられた。なお、樹種の判別には年度の違いは判別には影響を与えないことが示唆された (Fig. 18B)。今回は 3 樹種のみ分析結果であるが、成木の葉の脂肪酸分析データは、既往の論文で言及されている属レベルの植物種の判別だけでなく⁶²⁾、同一種内の分類や雑種判別においても化学分類学上の有益な情報として活用できるものと考えられる。しかし、生育地域などの環境要因が脂肪酸組成に及ぼす影響については、今後、更なる研究を進める必要がある。

葉の全脂質で認められた樹種間での脂肪酸組成の特徴が主要な葉緑体脂質であるグリセロ糖脂質群、あるいは小胞体で合成される中性リン脂質群のどちらに起因するのかを検討した。PL 画分の脂肪酸では (Table 12)、18:1/18:2&18:3 比はグイマツ、F₁、カラムツの順に有意に小さく、カラムツでは小胞体で合成されたリン脂質の構成脂肪酸のポリ不飽和化が最も進んでいた。このように、全脂質で見られた脂肪酸不飽和度の樹種間の違いは (Table 10)、PL 画分によるものであることが判明した。一方、GL 画分では、18:1 や 18:2 と比べて 18:3 の割合が圧倒的に高いこともあり、18:1/18:2&18:3 比には樹種間に有意差が認められなかった (Table 12)。また、18:3 の割合にも 3 樹種間での有意な違いは観察されなかった。以上の結果は、シアノバクテリアが起源とされる葉緑体での脂質合成後の包膜での脂肪酸デサチュラーゼ活性には樹種間での違いが無いが、小胞体膜内でのリン脂質を基質とした脂肪酸デサチュラーゼ活性が 3 樹種によって異なることを示すものであろう^{65, 66)}。

GL 画分の構成脂肪酸における樹種間での特徴としては、 $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比はカラムツ、F₁、グイマツの順に多く、3 樹種間で大きく異なっていた (Table 12)。

$\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比から判断すると、葉緑体でのグリセロ糖脂質合成の段階においては、小胞体で合成された C_{18}/C_{18} 型または C_{16}/C_{18} 型のジアシルグリセロール残基を有するグリセロリン脂質のうち、カラマツでは C_{18}/C_{18} 型がグイマツよりも多く利用されるものと考えられる。なお、PL 画分においては 3 樹種間での $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比の違いが軽微であったが、有意な差が観察された。

ヘキサデカトリエン酸 (16:3) は、Mongrand らや Jamieson と Reid の報告^{62, 64)} のように、多くは GL 画分に含まれていたが (Table 12)、微量であったことから、大部分のグリセロ糖脂質群のジアシルグリセロール部は小胞体起源の真核型経路によって合成されたものと推測された。

3 家系のグイマツ及び F_1 の苗木の葉の全脂質の脂肪酸組成を分析した結果 (Table 13)、苗木の特徴は成木と比較して 16:0 が顕著に少なく、18:3 が多いことであった。その結果、 $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比は、苗木では成木よりも高かった。このことは、葉の小胞体における脂質合成の初発段階 (リゾホスファチジン酸生成) でのアシルトランスフェラーゼの選択性が成長段階によって異なることを示唆するのかもしれない。また、18:1/18:2&18:3 比には成木のような樹種間の差が認められなかった。18:3 が主として葉緑体脂質であるグリセロ糖脂質の構成成分として存在すること (Table 12)、並びに苗木では 18:3 の割合が成木よりも高いこと (Table 13) を考え合せると、おそらく苗木では全脂質に占める糖脂質の割合が高く、リン脂質の割合が成木よりも低いと判断される。それゆえに、上述した成木の中性リン脂質群の構成脂肪酸に見られる 3 樹種間での差異が苗木の全脂質レベルには反映されないものと推測される。

苗木の葉の脂肪酸組成を使用してグイマツと F_1 の線形判別分析による判別を行ったところ、苗木でも樹種の判別が可能であった (Fig. 22)。 P 値がもっとも小さい脂肪酸は br-17:0 ($P < 0.05$, Prob $> F$) と 14:0 ($P < 0.1$, Prob $> F$) であった。

これらの脂肪酸はわずかな差であるが、3家系に共通して、br-17:0はF₁に多く、14:0はグイマツに多いために (Table 13)、*P*値が低いと考えられた。この2種の脂肪酸は成木でも *P*値が低かった ($P < 0.05$, $\text{Prob} > F$)。苗木では脂肪酸含有率の樹種間の差が小さいことから、3.3%の誤判別率 (30 個体中 1 個体の誤判別)であったが、この程度であれば判別法としては実用レベルでは問題にはならないと判断される。従って、採取された種子では混在する F₁とグイマツは判別ができないが、播種して苗段階で採取した葉の脂肪酸組成値は、雑種判別の指標として利用できると言えよう。

要約

2家系の F₁人工交配家系、グイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg.) × カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) (以下 F₁) とそれらの両親のクローンの葉の脂肪酸組成を分析した。成木と苗木の葉には共通して C₁₂ から C₃₂ までの 21 種の脂肪酸が認められ、その中で 18:3 が最も多く、次に 16:0 が多かった。18:2 と 18:3 の合計値に対する 18:1 の比 (18:1/18:2&18:3) は、成木の場合、グイマツよりもカラマツで低く、F₁ では両親種のグイマツとカラマツの中間の値であった。また、18:1/18:2&18:3 比にはグイマツと F₁ の間で有意差があったが、苗木では上記の特徴は観察されなかった。次いで、成木の糖脂質画分と中性リン脂質画分の脂肪酸組成を分析したところ、中性リン脂質画分では 3 樹種間で 18:1/18:2&18:3 比が有意に異なることを見出すとともに、両画分、特に糖脂質画分においては構成脂肪酸の $\Sigma C_{18}/\Sigma C_{16}$ 比が異なることを認めた。これらの樹種間での脂肪酸組成上の特徴を葉緑体と小胞体での脂質合成系とそれに引き続いて起こる脂肪酸不飽和化反応における基質特性や活性の視点から考察した。また、脂肪酸組成を基にして線形判別分析を行うと、成木と苗木の両者においてほぼ誤判別なくグイマツと F₁ を判別することが可能であった。このことは、採取された種子では混在するグイマツと F₁ を判別できないが、播種後の苗の葉の脂肪酸組成を分析すれば、雑種判別の指標として利用できることを意味している。

IV. ギイマツ雑種 F₁ 人工交配家系における葉のステロール組成とカラマツカルスのステロール脂質クラスにおけるメバロン酸添加の影響

第II章において、ジテルペンはギイマツ、カラマツ及びF₁を判別する有効な指標であることが明らかとなった。ジテルペンはアセチル-CoA からメバロン酸 (MVA) を経由して生合成される (Fig. 2)。同じ経路により生合成される化合物としてはステロールが挙げられる (Fig. 23)。植物には、ステロール脂質として遊離ステロール (FS)、アシルステロール (AS)、ステリルグルコシド (SG) 及びアシルステリルグリコシド (ASG) が広く存在している (Fig. 24)。AS は他のステロール脂質とともに多くの植物で研究されている⁶⁷⁾。AS の機能については、貯蔵^{68, 69)}、膜透過性の制御⁷⁰⁾、ステロール生合成^{71~75)} に関して研究されている。しかしながら、その役割は明らかになっていない。特に、裸子植物の組織におけるステロール脂質のステロール組成や機能に関する研究は十分には行われていない。

そこで、第IV章ではギイマツ、カラマツ及びそれらの人工交配雑種 F₁ の成木とギイマツと F₁ の苗木の葉におけるステロール組成を調べた。さらに、カラマツカルスのステロール組成を分析し、MVA の添加によるステロール脂質含有量への影響について検討した³⁹⁾。

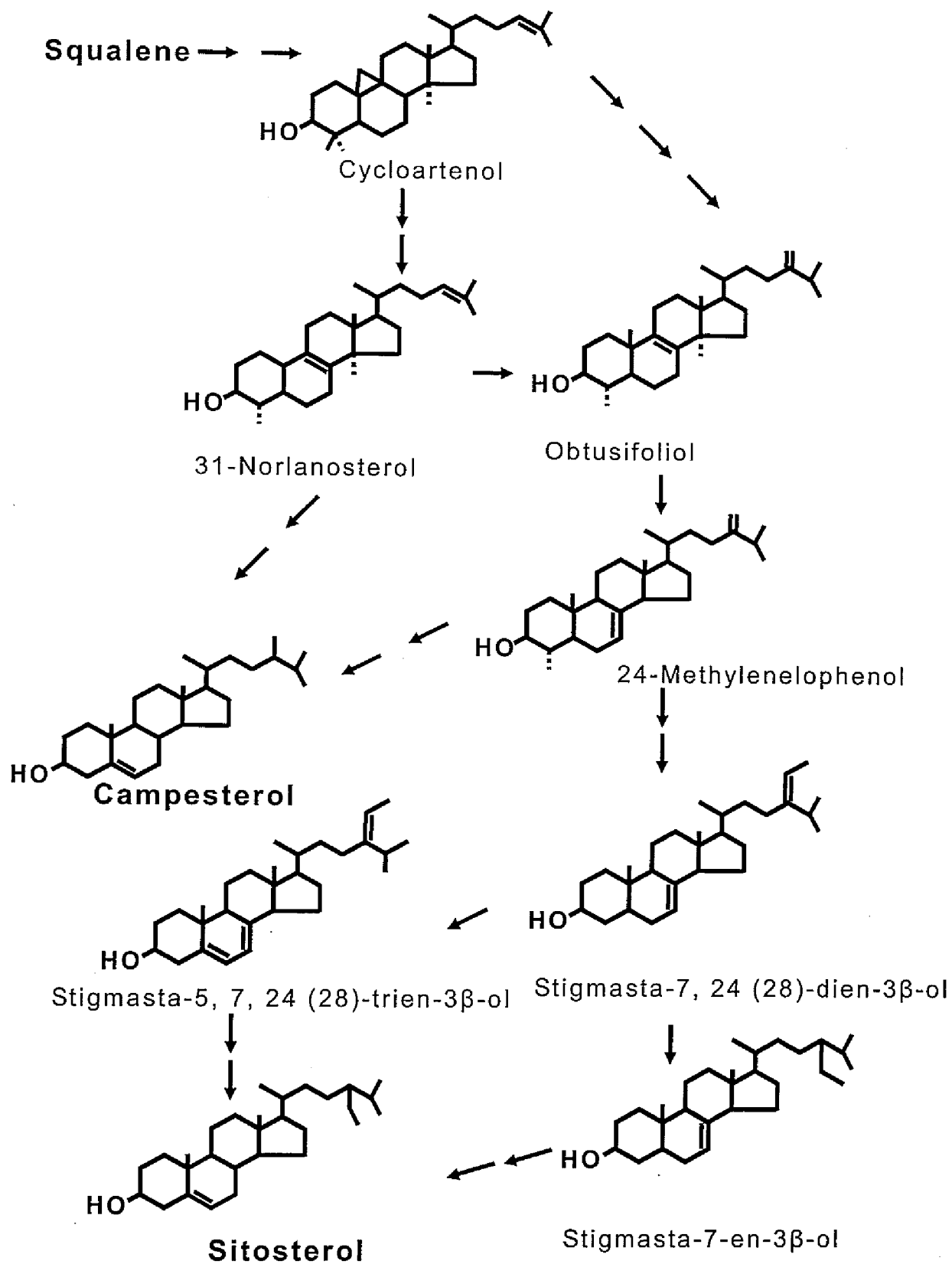
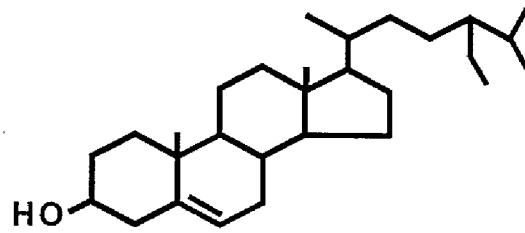
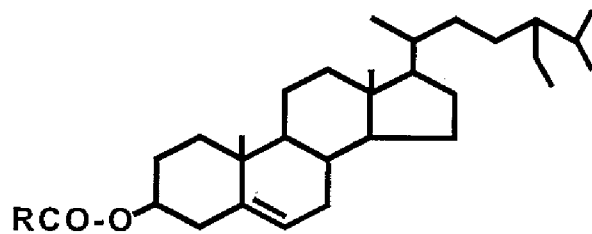


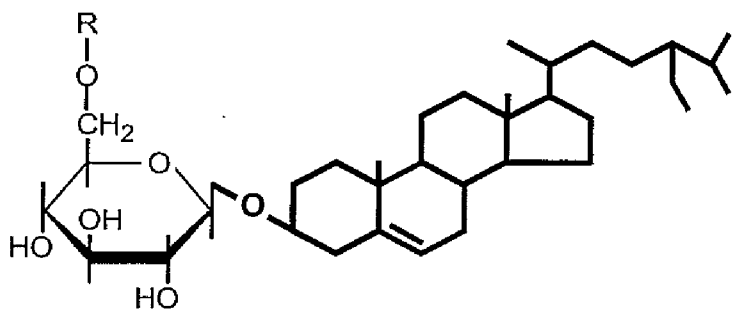
Fig. 23. Biosynthesis of Phytosterols in Plants.⁷⁶⁾



Free sterol (sitosterol)



Acylsterol, R = Acyl group



Steryl glucoside, R = H

Acylated steryl glycoside, R = Acyl group

Fig. 24. Structures of Sterol Lipids in Plants.

実験方法

1. 材料

成木の試料採取は、2005年9月に北海道立林業試験場（北海道美唄市；43°28'N, 141°88'E）で行った。分析に供した成木の葉は、32年生グイマツクロン（豊岡 111, 4ラメット；樺岡 168, 2ラメット）及び46年生カラマツクロン（十勝 35, 5ラメット；十勝 16, 5ラメット）、並びにグイマツ×カラマツの11年生F₁雑種2家系（豊岡 111×十勝 35, 6個体；樺岡 168×十勝 16, 4個体）の枝から採取した。

一方、実生の試料には、グイマツとカラマツがランダムに混植された雑種採種園（北海道有林網走東部森づくりセンター）で生産された種子を用いた。試料採取当時の樹高は、グイマツが約18m、カラマツが約16mであった。2004年8月に雑種採種園のグイマツから自然交配種子を採取し、得られた種子を2005年5月に林業試験場苗畑にて母樹別に播種した。なお、雑種採種園産種苗には雑種個体と純粋なグイマツ個体が混在しているが、これらはDNAマーカーによって苗木識別が行われた²³⁾。分析に使用した実生苗は、3母樹（中標津 121, 樺岡 484, 留辺蕊 28）由来の1母樹あたりグイマツ5個体、雑種5個体で、2006年9月に採取した。採取した枝は直ちに凍結保存し、葉の部分を分析に使用した。

2. 細胞培養

カルス誘導と培養は錦織⁷⁾の方法に従って行った。カラマツの種子は北海道立林業試験場構内（北海道美唄市）で採取した。成熟胚を種子から摘出し、カルス誘導に使用した。それら成熟胚を2.0 mg/l 6-benzylaminopurine を添加した

SH 液体培地⁷⁸⁾ 中で連続照明下 25℃の条件で回転培養した。カルスは 3 週間ごとに継代した。DL-MVA lactone (Sigma 社製) は蒸留水に溶解し、滅菌ろ過後、培地に添加した。MVA の添加濃度は 10 mM 及び 20 mM とした。カルスの成長は新鮮重量/初期新鮮重量で評価した。

3. 脂質抽出

採取した葉は、ホモジナイザー ((株)日本精機製作所製) により液体窒素中で粉碎した。15 μ g の BHT を含む 2 ml のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を葉粉碎物 150 mg に加え、10~15℃で 1 時間超音波抽出した。凍結乾燥したカルスは、クロロホルム-メタノール (2:1, v/v) 中でホモジナイズし、抽出した。抽出物を遠心分離し、上清を採取した。抽出は 4 回行い、合わせた上清を Folch⁶³⁾ の方法で水洗し、下層を全脂質とした。

4. ステロールの分析

全脂質に 5%メタノール性塩化水素 2 ml を加え、2 時間、100℃でメタノリシスした。反応終了後 1 ml の蒸留水を添加し、ジエチルエーテル 2 ml で 3 回抽出し、抽出物を 1 回水洗した。エーテル層を窒素乾固後、*N*, *O*-bis(trimethylsilyl) acetamide でトリメチルシリル誘導体化し、GC 分析した。

全ステロール含有量の測定は、全脂質に内部標準としてコレステロールを添加し、上記と同様にメタノリシスした。その後、遊離した構成ステロールをジエチルエーテルで抽出した。得られた抽出物をその後シリカゲル TLC に供し、ヘキサン-ジエチルエーテル (80:30, v/v) で展開した。TLC で分離された 4-デスマチルステロールを GC で分析した。

中性及び極性ステロールの分析のため、全脂質を Sep-Pak シリカカートリッ

ジ (Waters 社製) に供し、クロロホルム、アセトン及びメタノールで順に溶出し、それぞれ中性脂質、糖脂質及びリン脂質に分画した。中性ステロール組成と含有量の測定のため、中性脂質の一部を調製用 TLC に供し、ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸 (80:20:1, v/v/v) で展開して AS (R_f 値: 0.85) と FS (R_f 値: 0.17) をかきとった。AS には 1 N メタノール性水酸化カリウムを加え、100℃で 2 時間分解し、遊離したステロールを上述のように抽出し、分析した。糖脂質画分は 0.4 N メタノール性水酸化カリウムで 37℃、2 時間処理することにより、アルカリ安定脂質画分を得た。アルカリ安定脂質を TLC に供し、クロロホルム-メタノール (95:15, v/v) で展開し、SG (ASG を含む) (R_f 値: 0.21) を単離した。SG はその後、5% メタノール性塩化水素を加え 100℃で 2 時間分解した。遊離した構成ステロールはジエチルエーテルで抽出し、GC 分析に供した。

5. GC 分析

FS、AS 及び SG から分離した 4-デスメチルステロールは *N, O*-bis(trimethylsilyl) acetamide でトリメチルシリル誘導体化し、DB-1 (30 m × 0.32 mm i.d., Agilent 社製) を用いて、水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-14A, 島津製作所製) で分析した。カラム温度は 250℃、注入口及び検出器温度は 270℃とし、保持時間を標品 (カンペステロール及びシトステロール: タマ生化学社製) と比較し、ピークを同定した。分析は 3 回行い、ピーク面積からステロール組成を算出し、平均値と標準偏差を示した。

6. 統計解析

グイマツ、カラマツ及び F₁ 間のステロール組成の多重比較は Tukey-Kramer の HSD 検定 ($P < 0.05$) により行った。統計解析には JMP 5.0.1J (SAS Institute

Inc.製) を使用した。

実験結果

1. 葉のステロール組成

2 家系の F₁ 人工交配家系とそれらの両親のクローンについて、成木の葉のステロール組成を分析し、樹種間の違いを検討した (Table 14)。これら 3 樹種の主要なステロールはシトステロール (62~73%) 及びカンペステロール (28~39%) で、F₁ とそれらの両親の間にはジテルペンや脂肪酸に見られたような樹種間の違いが認められなかった。

3 家系のグイマツ及び F₁ の苗木について成木と同様にステロール組成を分析した (Table 15)。グイマツではシトステロールが 64~70%、F₁ では 62~67% であり、成木と同様に樹種間の違いがなかった。

2. カルスの成長における MVA の影響

葉のステロール組成には樹種間の違いが認められなかったことから、ステロール脂質の針葉樹組織における役割について検討した。カラマツ種子の成熟胚からカルスを誘導し、培地に MVA を添加した場合のステロール脂質の挙動を調べた。

MVA のカラマツカルスの成長への影響を調べるために、MVA 添加及び無添加培地 (コントロール) におけるカルスの新鮮重量を測定した (Fig. 25)。10 mM MVA 培地で培養したカルスの成長 (新鮮重量/初期新鮮重量) は、培養初期段階 (1~21 日) においてコントロールよりも 54%劣った。しかしながら、継代後 (21~42 日) は MVA の影響は認められなかった。

Table 14. Sterol Composition (mol%) of Total Lipids in *L. gmelinii* var. *japonica*, *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* F₁ Hybrids, and *L. kaempferi* Leaves

Sterol	Toyooka 111 family			Kabaoka 168 family		
	<i>L. gmelinii</i> ^{a,c}	F ₁ ^{b,d}	<i>L. kaempferi</i> ^e	<i>L. gmelinii</i> ^{a,f}	F ₁ ^{b,c}	<i>L. kaempferi</i> ^e
Campesterol	31.7±2.9	34.0±4.2	32.8±1.3	27.5±2.5	35.3±4.5	38.5±4.4
Sitosterol	68.3±2.9	66.0±4.2	67.2±1.3	72.5±2.5	64.7±4.5	61.5±4.4
Sitosterol/campesterol	2.17±0.27	1.98±0.37	2.06±0.12	2.63± 0.34	1.83±0.39	1.60±0.30

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Means ± S.D (^c n = 4, ^d n = 6, ^e n = 5, ^f n = 2).

Table 15. Sterol Composition (mol%) of Total Lipids in *L. gmelinii* var. *japonica* and *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* F₁ Hybrid Seedlings Leaves

Sterol	Nakashibetsu 121		Kabaoka 484		Rubeshibe 28	
	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b	<i>L. gmelinii</i> ^a	F ₁ ^b
Campesterol	32.7±4.5	38.3±3.2	35.7±6.0	32.6±5.7	29.8±7.0	33.7±5.5
Sitosterol	67.3±4.5	61.7±3.2	64.3±6.0	67.4±5.7	70.2±7.0	66.3±5.5
Sitosterol/campesterol	2.10±0.43	1.63±0.22	1.87±0.50	2.15±0.55	2.50±0.76	2.03±0.51

^a *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg.

^b *L. gmelinii* var. *japonica* Pilg. × *L. kaempferi* (Lamb.) Carr.

Means ± S.D (*n* = 5).

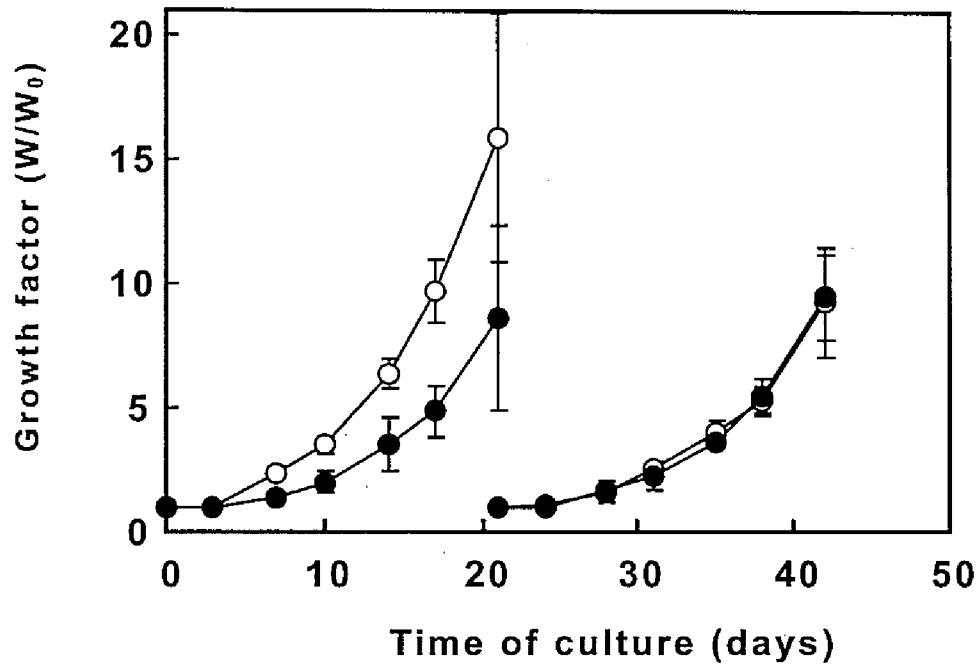


Fig. 25. Effects of MVA on Growth of *L. kaempferi* Calli.
 ○ and ● indicate the calli cultured in the control and MVA 10mM medium, respectively.
 W and W₀ indicate fresh weight and initial fresh weight, respectively.
 Error bars show standard deviation.

3. ステロール含有量における MVA の影響

MVA 添加培地及びコントロールで培養したカラマツカルの全脂質の TLC から AS、FS 及び 2 つのグリコシルステロール (SG 及び ASG) が認められた。コントロールで培養したカルの全ステロール含有量は、培養開始 42 日後に 2.06 mg/g であり、FS : AS : SG (ASG を含む) 比は 1.0:0.1:0.8 であった (Table 16)。カルスを 10 mM MVA 添加培地で培養すると、全ステロール含有量はコントロールの 2 倍になった。FS とグリコシルステロールの含有量 (それぞれ 1.0 及び 0.8 mg/g) は MVA によって影響を受けなかったが (それぞれ 0.7 及び 0.6 mg/g)、AS 含有量は MVA 添加培地及びコントロールにおいて、著しい違いが認められた (それぞれ 1.8 及び 0.1 mg/g)。このことから、MVA による全ステロール含有量の増加は、AS によるものであることが示された。培地に MVA を 20 mM 添加した場合、ステロール脂質の含有量は 10 mM 添加とほぼ同じであった (Table 16)。

カルの成長に伴うステロール脂質含有量の変化を分析したところ (Fig. 26)、培地への MVA の添加により、培養 3 日目には FS 含有量が減少した。この FS の減少は、コントロールと比較して培養初期段階の成長が劣ったことが原因と考えられる。培養 42 日目までには、FS 含有量は徐々にコントロールのレベルまで増加した。コントロールでは、AS 含有量が培養期間を通して一定であった。一方、MVA 添加培地で培養したカルの AS 含有量は、培養日数に伴い著しく増加した (10 倍)。この傾向はその後の継代後も繰り返し観察された。しかしながら、AS 含有量は 3 回目の継代培養を除いて、3 週間の継代ごとにその後期には 64% 減少する傾向を示し、これらは培地中の MVA の消費によるものと推察された。培養 42 日目にカルスを MVA 添加培地からコントロールに継代すると、AS 含有量はコントロールのカルのレベルまで減少した (Fig. 26)。この結果

Table 16. Total Sterol Contents (mg/g dry calli) and Proportions of Sterol Lipid Classes in *L. kaempferi* Calli Cultured with and without Mevalonic Acid

	Mevalonic acid concentration		
	0 mM	10 mM	20 mM
Total sterols	2.06±0.22	4.23±0.06	4.53±0.09
Free sterol	1.0	1.0	1.0
Acylsterol	0.1	2.6	3.1
Glycosylsterol	0.8	0.9	1.0

Values are means ± SD (n=3).

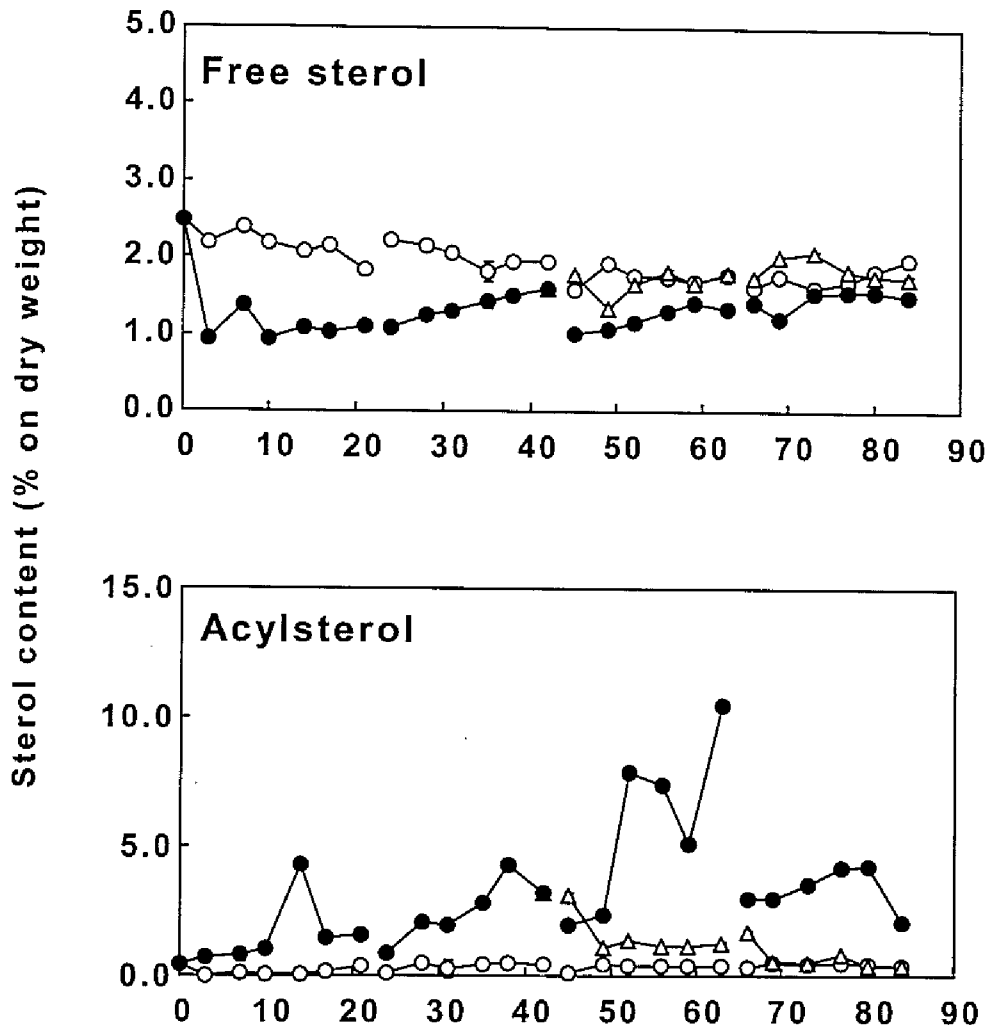


Fig. 26. Effects of MVA on Free Sterol and Acylsterol Contents of *L. kaempferi* Calli.

○, ●, and △ indicate the calli cultured in control, MVA 10mM and the calli cultured in MVA 10mM medium transferred to the control medium at 42 days, respectively.

Error bars show standard deviation.

により、カルス中に貯蔵された AS は優先的に FS へ分解されて、成長に使われていることが示唆された。

4. 各脂質クラスのステロール組成における MVA の影響

カラマツカルスの構成ステロールの組成を分析した (Table 17)。シトステロールとカンペステロールが認められ、前者は MVA 添加及びコントロールで生育したカルスのいずれでも、各脂質クラス (FS, AS, SG) において常に優先的 (90~100%) であった。コントロールではシトステロールの割合が 98%以上であり、一方、MVA 添加培地ではシトステロールがわずかに少なく、カンペステロールは 2~11%であった。さらに、培養期間を通して構成ステロールの組成には違いがなかった (Fig. 27, 28)。

Table 17. Effects of Administered Mevalonic Acid Concentration on Sterol Composition (%) of Each Sterol Lipid Class in *L. kaempferi* Calli

	Mevalonic acid concentration		
	0 mM	10 mM	20 mM
Free sterol			
Sitosterol	98.1±0.4	97.1±0.8	95.8±0.9
Campesterol	1.9±0.4	2.9±0.8	4.2±0.9
Acylsterol			
Sitosterol	100.0±0.0	92.3±0.2	89.5±0.3
Campesterol	0.0±0.0	7.7±0.2	10.5±0.3
Glycosylsterol			
Sitosterol	98.3±0.0	97.9±0.4	96.9±0.2
Campesterol	1.7±0.0	2.1±0.4	3.1±0.2

Values are means ± SD (n=3).

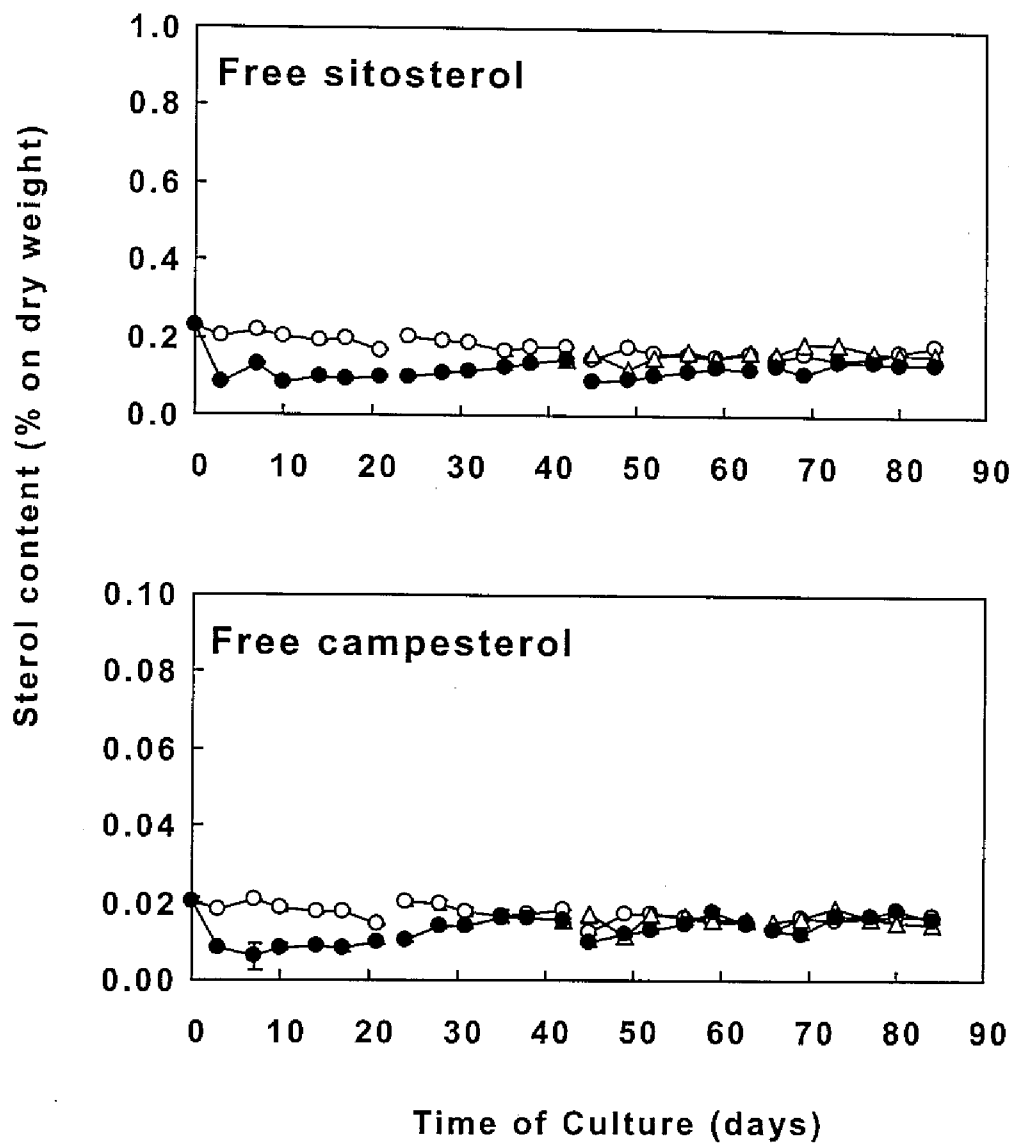


Fig. 27 Effects of MVA on Free Sterol Content of *L. kaempferi* Calli.

○, ●, and △ indicate the calli cultured in control, MVA 10mM and the calli cultured in MVA 10mM medium transferred to the control medium at 42 days, respectively.

Error bars show standard deviation.

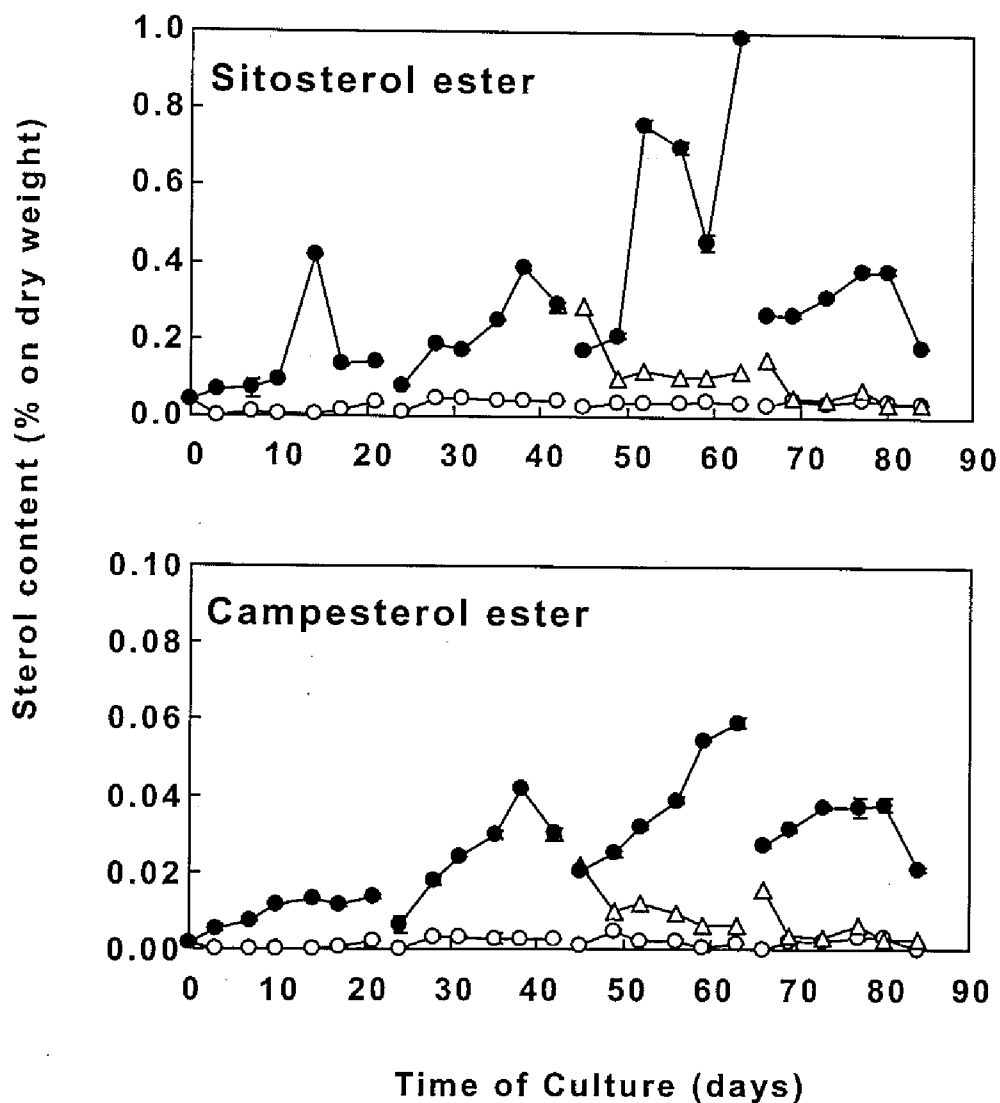


Fig. 28 Effects of MVA on Acylsterol Content of *L. kaempferi* Calli.

○, ●, and △ indicate the calli cultured in control, MVA 10mM and the calli cultured in MVA 10mM medium transferred to the control medium at 42 days, respectively.

Error bars show standard deviation.

考察

第Ⅱ章では、樹皮のジテルペン含有量はグイマツ、カラマツ及び F₁ の樹種間で特徴があり、ジテルペン含有量を基に樹種の判別が可能であることを示した。また、第Ⅲ章では葉の脂肪酸組成により、樹種の判別が可能であることを示した。ジテルペンは MVA から GDP、FDP、GGDP を経て生合成される (Fig. 2)。一方、ステロールはジテルペンと同様に MVA から GDP と FDP を経た後、squalene を経て生合成される (Fig. 2, 23)。そこで、第Ⅳ章ではジテルペンと同様の経路で生合成されるステロール脂質についてグイマツ、F₁、カラマツの樹種間の特徴を調べた。しかしながら、成木 (Table 14) 及び苗木 (Table 15) の樹葉のステロール組成には樹種間に違いが認められなかった。この原因を探るため、カラマツカルスを用いて、組織におけるステロールの役割について検討した。

カラマツカルスの培地に過剰量の MVA を添加すると、カルスにはエステル化された 4-デスメチルステロールが多量に蓄積することが示された (Table 16)。一方、膜の構成に寄与する FS とグリコシルステロールなどの極性ステロール脂質は、カルスにおいては外因性 MVA の影響を受けなかった (Table 16)。これらの結果は、裸子植物の細胞で生合成された過剰な FS は、ステロールの貯蔵のために AS へ変換されることを示唆している。

カルスを MVA 添加培地からコントロールに継代すると、AS 含有量はコントロールのカルスのレベルまで減少した (Fig. 26)。この結果により、カルス中に貯蔵された AS は優先的に FS へ分解されて、成長に使われることが示唆された。

Dyas らはセロリ懸濁培養細胞では、成長サイクルを通して AS 含有量が FS 含有量よりも高いことを見出している⁷⁹⁾。しかしながら、この現象が植物懸濁

培養細胞に共通の特徴か、セロリの特徴なのかは明らかではない。コントロールのカラマツカルスでは、培養を通して FS が主要なステロール脂質であった (Table 16)。加えて、MVA 存在下では AS 含有量は著しく増加するが、FS は増加しない。Wilkinson らは外因性 MVA の添加は AS 含有量の増加を引き起こすが、FS 含有量にはほとんど影響がないことを報告しており⁸⁰⁾、このことは今回の結果と一致している。これらのことは MVA の添加は裸子植物と被子植物の両者において AS 含有量の増加を引き起こすことを示している。

2つのグリコシルステロール (SG 及び ASG) などの極性ステロールは膜脂質として働くことが示されている⁸¹⁾。また、Kemp らは発芽中のトウモロコシ実生において FS が膜の構造機能を担うことを示している⁶⁸⁾。この研究では、MVA の添加によりステロール生合成における前駆物質が増加しても、カラマツカルスの極性ステロール脂質と FS は一定量に維持されていることを見出した。このように、細胞膜を構築する FS 及びグリコシルステロールのようなステロール脂質は一定の含有量に維持されており、外因性 MVA から生合成された過剰なステロールはエステル化ステロールである AS として貯蔵されることが示唆された。

これらの結果から、ステロール量が増加するような条件下においても、膜ステロール脂質の含有量や構成ステロールの組成が一定に保たれているため、ステロール成分には樹種間での顕著な差が認められないと考えられた。

要約

2家系の F₁人工交配家系、グイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica* Pilg.) × カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) (以下 F₁)とそれらの両親のクローンの成木及び3家系の苗木の葉のステロール組成を分析し、樹種間の違いを検討した。これら3樹種の主要なステロールはシトステロール及びカンペステロールであったが、3樹種のステロール組成にはジテルペンや脂肪酸に見られたような樹種間の違いが認められなかった。

カラマツカルスにおいて、遊離ステロール (FS)、アシルステロール (AS) 及びアシルタイプを含むグリコシルステロールが 1.0:0.1:0.8 の比で認められた。カルスを 10 mM メバロン酸 (MVA) 存在下で培養すると、AS 含有量は著しく増加したが、FS とグリコシルステロールは増加しなかった。各ステロール脂質クラスの主要な構成ステロールはシトステロール (90%以上) であり、少量のカンペステロールを伴っていた。MVA の存在の有無にかかわらず、カルスの構成ステロール組成には違いがなかった。カルスを 10 mM MVA 培地で6週間培養後、MVA 無添加培地に継代すると、AS 含有量は無添加培地のカルスのレベルまで減少した。このように、細胞構造を担う FS 及びグリコシルステロールのようなステロール脂質は一定の含有量に維持されており、外因性 MVA から生合成された過剰なステロールはエステル化ステロールである AS として貯蔵されることが示唆された。これらの結果から、ステロール量が増加するような条件下においても、膜ステロール脂質の含有量や構成ステロールの組成が一定に保たれているため、ステロール成分には樹種間での顕著な差が認められないと考えられた。

V. 総合考察

カラマツは昭和30年代の拡大造林期に北海道で盛んに造林され始めたが⁸²⁾、先枯れ病⁸³⁻⁸⁷⁾ や野そ害^{16, 17, 26, 28, 56, 88-90)} に弱く、幹のねじれや曲がりが多い⁹¹⁾ などの問題を抱えていた。一方、グイマツは成長が遅く造林樹種には適さないが、先枯れ病や野そ害に強く、幹の通直性や材の強度など材質面でも優れた特徴を持っている。このことから北海道では早い時期からグイマツとカラマツの交雑種が注目され、それらの材質や成長量に関する試験が行われてきた⁸²⁾。その結果、グイマツを母樹とし、カラマツを花粉親とするグイマツ雑種 F_1 の成長量はカラマツと同等以上であり、雑種強勢(ヘテロシス)を示す一方、気象害や野そ害に対する抵抗性や材質、通直性に関してはグイマツの性質を受け継ぎ、優れた性質を有することが明らかとなっている⁹²⁾。これらの優れた性質を持つ F_1 は北海道の有望な造林樹種であると考えられており、近年の植栽希望量は増加傾向にあることから、 F_1 種苗の供給量は不足している⁹³⁾。

F_1 の種苗生産において、現在はグイマツと F_1 の種子を判別することができない。そのため、現在はそれらの苗木の形態的特徴やフェノロジーの特徴によって F_1 を判別している。しかし、これらの特徴による判別は確実性と効率に問題がある。また、近年報告されている、分子マーカーを用いた F_1 苗の識別法²²⁻²⁴⁾は有効な判別法であるが、時間がかかることやコストに問題がある²⁵⁾。一方、近赤外分光法は近年多くの分野で活用されており⁹⁴⁾、現場での使用に向けたポータブル近赤外分光分析装置の利用に関する研究も行われている⁹⁵⁾。林産分野においては、木材の強度推定への利用に関する研究も進んでいる⁹⁶⁾。グイマツと F_1 の樹木成分の違いが明らかとなれば、将来的には近赤外分光法などの非破壊的な分光光度法を利用した、効率的で低コストの雑種判別が可能となるかもし

れない。

F₁に関するこれまでの研究は、成長量や材質などの性質を基にした優良品種の選抜、形態的特徴やフェノロジーによる苗木の判別^{18, 19, 97}、耐そ性^{16, 17, 26-31, 56, 88-90, 98}に関する研究が中心であり、樹木成分に関する系統的な研究は行われていない。耐そ性に関する研究では、これらの樹種のジテルエーテル抽出物^{28, 31}、特にジテルペン含有量³²に違いがあることが報告されている。そこで、著者はグイマツ、カラマツ及びF₁の樹木成分の特徴を明らかにし、樹木成分によるグイマツとF₁の苗木の判別を試みた。本研究では特にグイマツ、カラマツ及びF₁において含有量の違いが指摘されているジテルペンのほか、ジテルペンと同様にメバロン酸経路を経て生合成されるステロール脂質 (Fig. 2, 23) 及びメバロン酸の前駆物質であるアセチルCoAから生合成される脂肪酸について樹種の特徴を明らかにした。

成木の樹皮のジテルペン組成の特徴 (Table 2) をジテルペンの生合成経路 (Fig. 15) の観点から考察すると⁴⁰、グイマツはカラマツと比べて CDP から labdane 型ジテルペンの合成流量が多い一方、カラマツはグイマツよりも pimarane を経た abietane 型ジテルペンの生合成量が多いと考えられる (Table 6)。また、F₁ は、両親種の中間の性質を示しており、ジテルペンの生合成は遺伝的に制御されていることが示唆された。

苗木の樹皮のジテルペン組成は成木と同様の傾向であった。しかしながら、総ジテルペン含有量は、成木に比べ著しく少なく、特に labdane 型ジテルペンが少なかった (Table 4)。このことから、苗木のジテルペン代謝流には成木と同様の傾向が認められるものの、labdane 型ジテルペンの生合成量は成長段階によって異なることが示唆された。

針葉樹のジテルペンについては耐そ性³⁰や耐病虫害との関連から研究が行

われているが、本研究においても、ジテルペン含有量と耐そ性との関連性が強く示唆された (Table 2)。

針葉樹において、創傷⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ や methyl jasmonate^{102, 103)} により、樹脂酸などのジテルペンの増加が誘導されることが報告されている。最近ではジテルペンである sclareol による植物の ATP binding cassette transporter の誘導が報告された^{104, 105)}。Grec らは、*Nicotiana plumbaginifolia* の細胞において、ATP binding cassette transporter (*NpABCI*) が sclareol や sclareolide に限らず abietic acid と larixol によっても誘導されることを示しており¹⁰⁶⁾、これらのメカニズムとして methyl jasmonate がジテルペン生合成を刺激した結果、*NpABCI* が発現すると考えられている。カラマツの重要病害の一つにカラマツ先枯病 (原因病菌: *Guignardia laricina* (SAWADA)) がある。佐藤らはカラマツ先枯病の耐病性について、グイマツはカラマツより高く、F₁ は両親種の間であることを報告している⁸⁵⁾。小口は、カラマツ先枯病が風衝地に多いことから、風による機械的な損傷部位への菌の進入がこの樹病の原因であると考え、樹種による耐病性と新梢に含まれる成分との関連を示唆している⁸⁷⁾。これらのことから、グイマツ、カラマツ及び F₁ のジテルペン含有量とそれらの耐そ性及び耐病性は、大きく関連していると考えられる。ジテルペン含有量、特に larixol 含有量は変異幅が大きいことから (Table 2)、育種効果が十分に期待できると考えられる。北海道産針葉樹の病虫害と樹木成分との関連性に関する知見はまだ少ないが、樹木成分を耐病虫害性の高い品種の指標として育種に利用することは可能であると考えられることから、今後の研究が望まれる。

さらに本研究では、成木の樹葉の脂肪酸組成を分析し (Table 10)、樹種間での脂肪酸組成の特徴を葉緑体と小胞体での脂質合成系とそれに引き続いて起こる脂肪酸不飽和化反応における基質特性や活性の視点から考察した。

Fig. 29 に高等植物におけるグリセロ脂質の合成経路を示す。グリセロ脂質の生合成は、葉緑体内で生成した脂肪酸を原料として、葉緑体と小胞体の 2 箇所で行われ、その過程はグリセロール 3 リン酸からの PA の合成、PA からの各種脂質の合成及びそれら脂質の構成脂肪酸の不飽和化の 3 段階から成る。葉緑体での脂質合成ではグリセロール 3 リン酸の *sn*-1 の位置には主として 18:1 あるいは 16:0 が転移される。これに対し、*sn*-2 の位置には常に 16:0 アシル基が転移される。このような特異性はシアノバクテリアで観察されるので、植物葉緑体でのグリセロ脂質の *de novo* 合成系は「原核型経路」と呼ばれる (Fig. 30)。一方、小胞体膜では、*sn*-1 は 18:1、16:0 あるいは 18:0 アシル基によりエステル化されるが、*sn*-2 には常に C₁₈ アシル基が転移される。この小胞体膜でのグリセロ脂質の *de novo* 合成系は「真核型経路」と呼ばれる (Fig. 30)。

葉緑体での原核型経路を経て生成された PA からは、PG のほか、アカザ科の植物などではガラクト糖脂質が生成され、その後、脂肪酸デサチュラーゼによる不飽和化を受ける (Fig. 31)。この場合、*sn*-1 の C₁₈ 脂肪酸のほか、MGDG や DGDG では *sn*-2 の C₁₆ 脂肪酸がポリ不飽和化されて 16:3 含有型に転換される。この葉緑体包膜で生成されたガラクト糖脂質は原核型ガラクト糖脂質と呼ばれる。それ故に、16:3 が検出される植物は「原核型経路」によるガラクト糖脂質合成系を有している判断される。しかし、多くの植物では葉緑体包膜で合成された PA を DG に転換する酵素が欠損しているため原核型ガラクト糖脂質は存在しない。一方、小胞体膜で作られた PA からは PI と PG が生成され、その後、DG を経て PE と PC が生成される。これらの脂質は、生成後に脂肪酸デサチュラーゼによる不飽和化を受ける。小胞体で生成されたリン脂質（おそらく PC）の一部は葉緑体包膜に転送されて DG に加水分解された後、葉緑体においてグリセロ糖脂質（真核型ガラクト糖脂質）の生合成に利用される (Fig. 31)。この時、

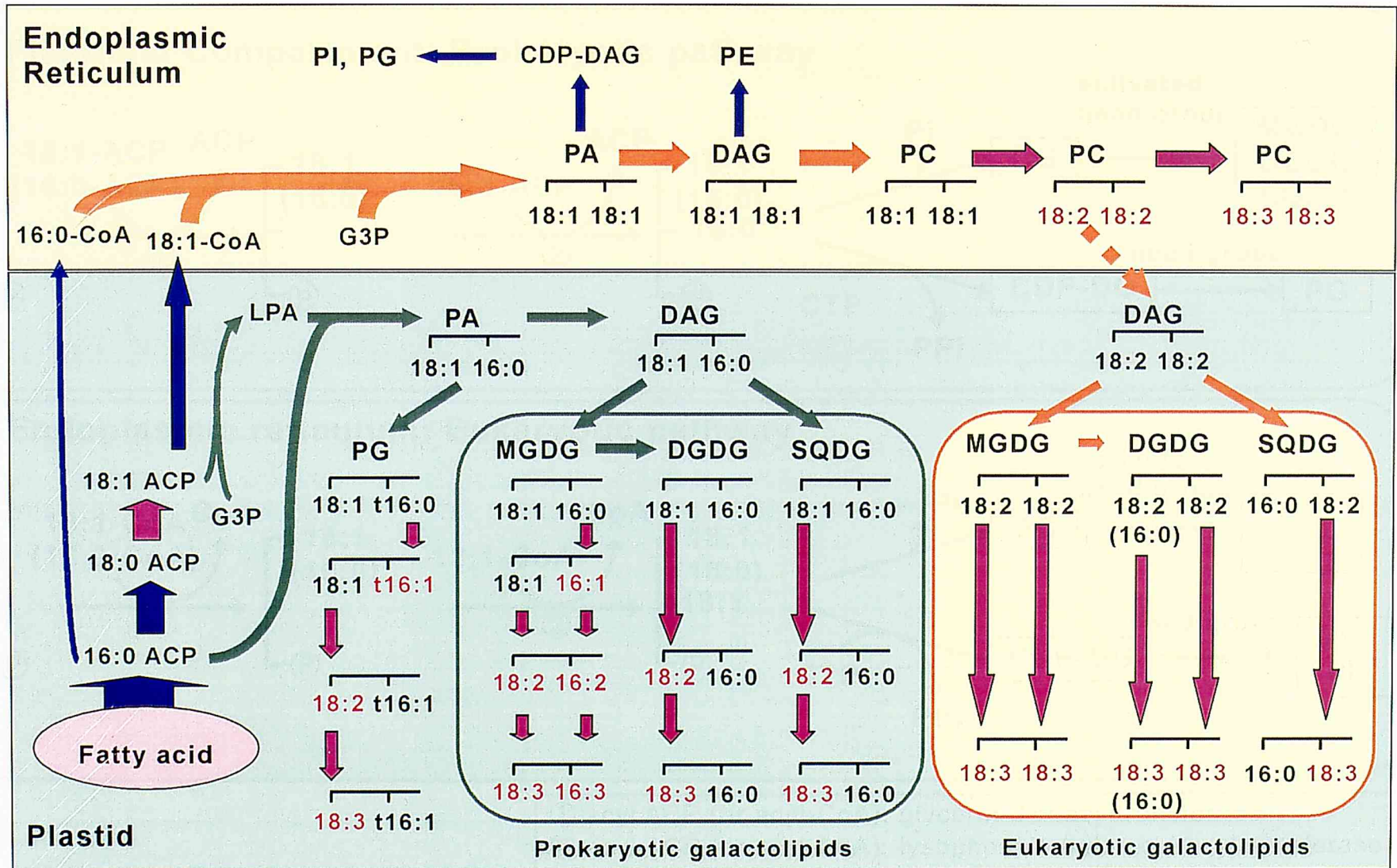


Fig. 29. Scheme of the Lipid Metabolic Pathway in Photosynthetic.⁶⁵⁾

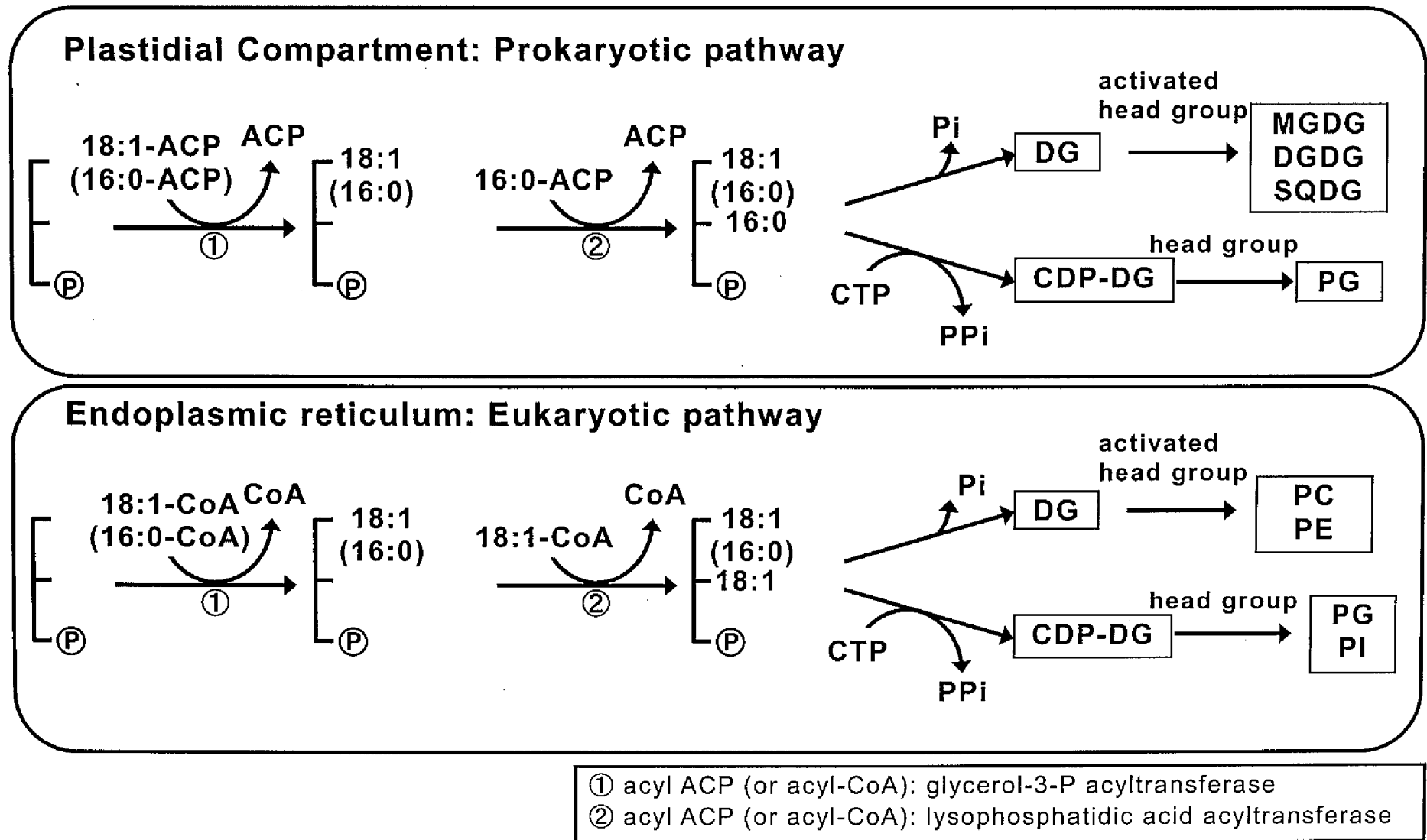


Fig. 30. Glycerolipids Biosynthetic Pathways in Plants. ^{57, 59)}

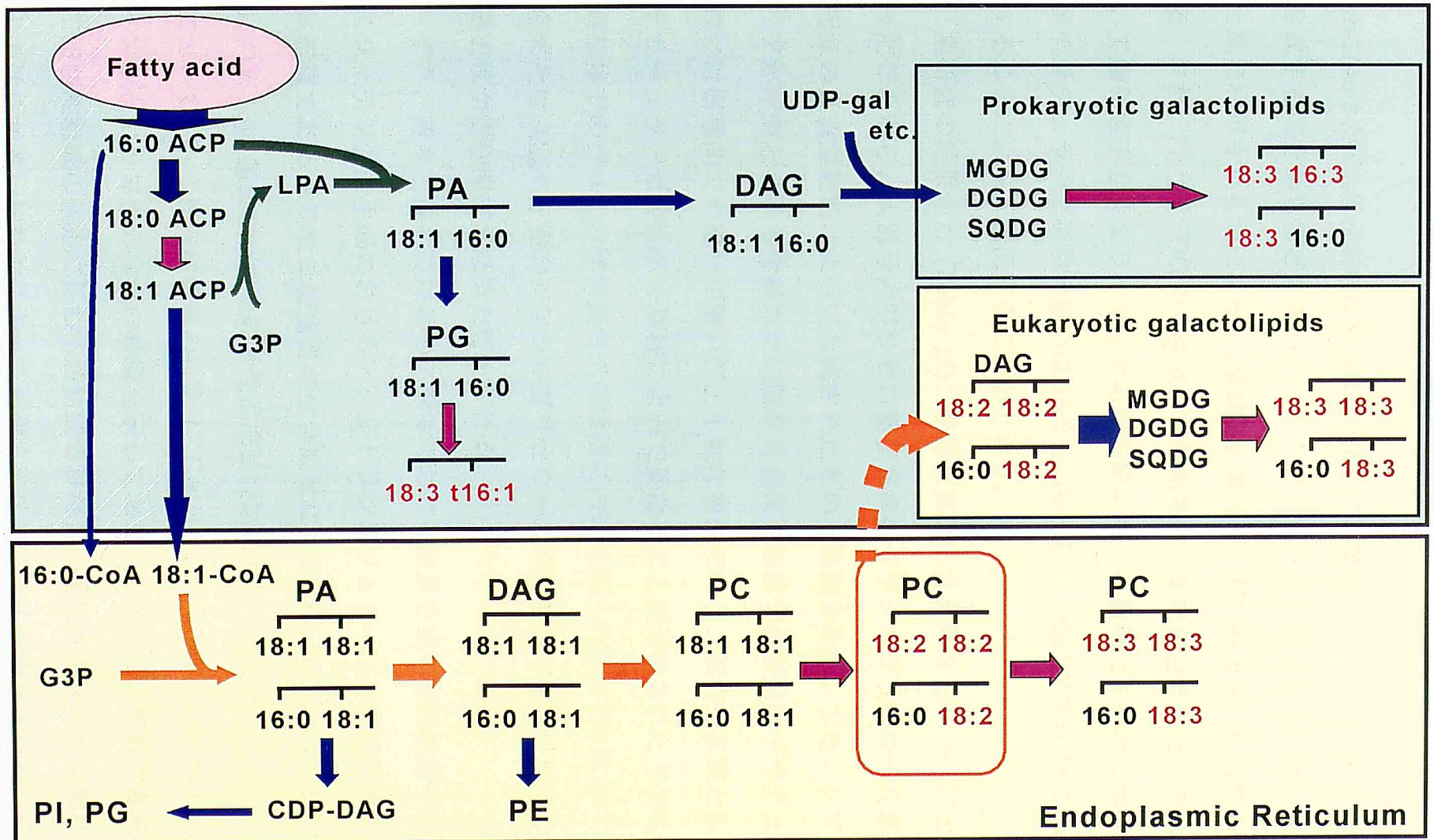


Fig. 31. Scheme of the Lipid Metabolic Pathway in Photosynthetic Tissues.^{59, 61)}

sn-1/sn-2 が C₁₈/C₁₈ または C₁₆/C₁₈ である 2 種類のジアシルグリセロール残基が生成することから、どちらのジアシルグリセロール残基がグリセロ糖脂質の生合成に利用されるかによって、構成脂肪酸の C₁₈ 脂肪酸と C₁₆ 脂肪酸の比が異なる。また、PA 及び DG から生成した各脂質は、葉緑体包膜または小胞体膜において脂肪酸デサチュラーゼによる脂肪酸のポリ不飽和化を受けるが、この脂肪酸デサチュラーゼ活性の違いは 18:2 と 18:3 の合計値に対する 18:1 の比を算出することにより、推測することができる。

本研究の結果から (Table 12)、糖脂質画分に含まれる 16:3 が 4% と微量であったことから、大部分のグリセロ糖脂質群のジアシルグリセロール部は小胞体起源の真核型経路によって合成されたものと推測される。また、シアノバクテリアが起源とされる葉緑体での脂質合成後の包膜での脂肪酸デサチュラーゼ活性には樹種間での違いが無いが、小胞体膜内でのリン脂質を基質とした脂肪酸デサチュラーゼ活性が 3 樹種によって異なることが示唆された^{65, 66)}。さらに、葉緑体でのグリセロ糖脂質合成の段階においては、小胞体で合成された C₁₈/C₁₈ 型または C₁₆/C₁₈ 型のジアシルグリセロール残基を有するグリセロリン脂質の選択性が樹種間で異なると考えられる。

また、苗木と成木では葉の小胞体における脂質合成の初発段階であるリゾホスファチジン酸生成におけるアシルトランスフェラーゼの脂肪酸選択性や葉緑体脂質であるグリセロ糖脂質の生合成量に違いがあることが示唆され (Table 10, 12, 13)、脂質生合成系の活性は成長段階において異なることが推測された。成木において、F₁ の脂肪酸組成の特徴 (Σ C₁₈/ Σ C₁₆ 比及び 18:1/18:2&18:3 比) はグイマツとカラマツの中間の特徴を示しており、このことは脂質生合成系において脂肪酸組成の決定に係わる脂肪酸転移酵素の選択性や脂肪酸不飽和化酵素などの活性が遺伝的特性によって制御されているためと推測される。このような

生合成の遺伝的制御は、ジテルペン生合成にも同様に認められ (第 II 章)、ジテルペンや脂肪酸は雑種判別の有効な指標となることを示唆している。

しかしながら、葉のステロール組成は成木と苗木の両者において 3 樹種間にこのような傾向が認められなかった (Table 14, 15)。この理由を針葉樹組織におけるステロールの役割から検討するため、カラマツ培養細胞の培地にステロール前駆体、MVA を添加し、ステロール生合成への影響について研究を行った。ステロール脂質の機能については、SG と ASG⁸¹⁾ 及び FS⁶⁸⁾ が膜の構造機能を担うことが示唆されている。本研究の結果、ステロール量が増加するような条件下においても、膜ステロール脂質の含有量や構成ステロールの組成が一定に保たれているため、ステロール脂質には樹種間での顕著な差が認められないと考えられた。なお、Wilkinson らは MVA 処理した細胞の AS 画分では 4, 4-ジメチルステロールの割合が増加するが、これら細胞中の 4-モノメチルステロールと 4-デスメチルステロールの割合はコントロール細胞よりも低いことを報告している⁸⁰⁾。また、Wilkinson らは AS が過剰量の前駆体ステロール、特にシクロアルテノールを貯蔵する役割を果たすことも示している⁸⁰⁾。それゆえ、カラマツカルスにおけるステロール脂質生合成の更なる解明のためには、4, 4-ジメチルステロールと 4-モノメチルステロールの組成及び含有量の検討が重要であると考えられる。

これまでにジテルペン^{33~35)} や脂肪酸^{61, 62)} 組成を基にした、樹木の分類が行われている。Mongrand らは葉の脂肪酸組成を基に、多変量解析を使用して裸子植物を分類している⁶²⁾。この中で *Larix* 属については *L. gmelinii* (Rupr.) Kuzen と *L. kaempferi* (Lamb.) Carr. を含む 6 種が分析されている。主成分分析ではこの 2 種が同じクラスターに含まれているが、階層型クラスター解析ではベヘン酸 (22:0) の含有率によって異なるクラスターに分類されることが報

告されている。しかしながら、ジテルペン及び脂肪酸組成による種間雑種とそれらの親種との判別に関する研究は、これまでにほとんど行われていない。本研究では、グイマツと F₁ の苗木をジテルペン及び脂肪酸の特徴によって線形判別分析により判別することを試みた。5 交配家系の苗木の枝の樹皮に含まれる 7 種のジテルペン含有量を基に判別を行った場合、誤判別率は 7.7%であった。このことは複数の家系に由来する苗木であっても、樹皮のジテルペン含有量により F₁ を判別できることを意味している (Fig. 12)。この判別には、13-epimanool、larixol、abietic acid 及び isopimaric acid の寄与が高く、これらの含有量を分析することにより雑種判別が可能であると考えられた。なお、ジテルペン含有量は 5 家系に共通して F₁ よりもグイマツに多いため (Table 4)、各ジテルペンの mol%よりも含有量 (nmol/bark mg) を判別分析に供した方が樹種の特徴が明確になり、誤判別率を下げるのが可能であった。

一方、苗木の葉のジテルペン組成についても同様に分析を行ったが、家系別の樹種誤判別率は 13.5~28.6%、5 家系の全苗木の樹種誤判別率は 35.4%と高かった (Fig. 13, 14)。このことから、ジテルペンを指標とした判別には葉よりも樹皮が適していると考えられた。苗木の葉において誤判別率が高いのは、葉のジテルペン含有量が少なく、特にグイマツでは labdane 型ジテルペンの生合成量が成木に比べて苗木で少ないため、樹種間に有意な差が出ないことが原因と考えられる (Table 5, 9)。

葉においては、C₁₂ から C₂₂ までの 14 種の脂肪酸組成を使用した線形判別分析により、成木のグイマツと F₁ を誤判別率なく判別ができることが示された (Fig. 18A)。さらに苗木においても樹種の判別が可能であった (Fig. 22)。P 値がもっとも小さい脂肪酸は br-17:0 と 14:0 であった。苗木では脂肪酸組成の樹種間の差が小さいことから、誤判別率が 3.3%となったが、判別法としては実用レ

ベルでは問題にはならないと判断される。なお、樹種の判別には年度の違いは判別には影響を与えないことが示唆された (Fig. 18B)。葉の脂肪酸組成を基にグイマツと F₁ の判別を行った場合、誤判別率を 10%以下にするには最少で 7 種の脂肪酸 (12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 16:3, br-17:0, 18:0) が必要であった (Fig. 32)。樹種の判別をより容易にするためには、判別に必要な成分が少ない方が好ましいと考えられる。そこで、葉に含まれる脂肪酸とジテルペンを組み合わせてグイマツと F₁ の判別を行った。3 母樹 (中標津 121, 樺岡 484, 留辺蕊 28) 由来の 1 母樹あたりグイマツ 5 個体、F₁ 5 個体について、葉に含まれる 6 種のジテルペン (larixol, 13-epitorulosyl acetate, isopimaric acid, abietic acid, dehydroabietic acid, neoabietic acid) の含有量を基に判別分析を行った場合の誤判別率は 30%であり、この判別への寄与が高いジテルペンは abietic acid ($P < 0.05$, $\text{Prob} > F$)、larixol、isopimaric acid 及び neoabietic acid (いずれも $P < 0.1$, $\text{Prob} > F$) であった (Fig. 33A)。この判別に供した中標津 121 及び樺岡 484 の 2 家系の個体においては、abietic acid、larixol、isopimaric acid、neoabietic acid は共通して F₁ よりもグイマツに多かった。また、含有率の高い脂肪酸 (16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3) と樹種の特徴を表すと考えられる br-17:0 を用いた場合の誤判別率は 16.7%であり、この判別への寄与が高い脂肪酸は br-17:0 ($P < 0.01$, $\text{Prob} > F$) と 16:0 ($P < 0.05$, $\text{Prob} > F$) であった (Fig. 33B)。br-17:0 は 3 家系に共通してグイマツより F₁ に多く、16:0 は F₁ よりグイマツに多いため、 P 値が小さいと考えられる (Table 13)。これらの結果から、判別への寄与が高く、なおかつ含有量の多い larixol、abietic acid、16:0、br-17:0、18:3 を選択して判別分析を行うと誤判別率は 10%となり (Fig. 34A)、これらにさらに isopimaric acid を加えることにより、誤判別率を 6.7%に下げることが可能であった (Fig. 34B)。これらのことから、樹種の特徴を表す比較的含有量の多

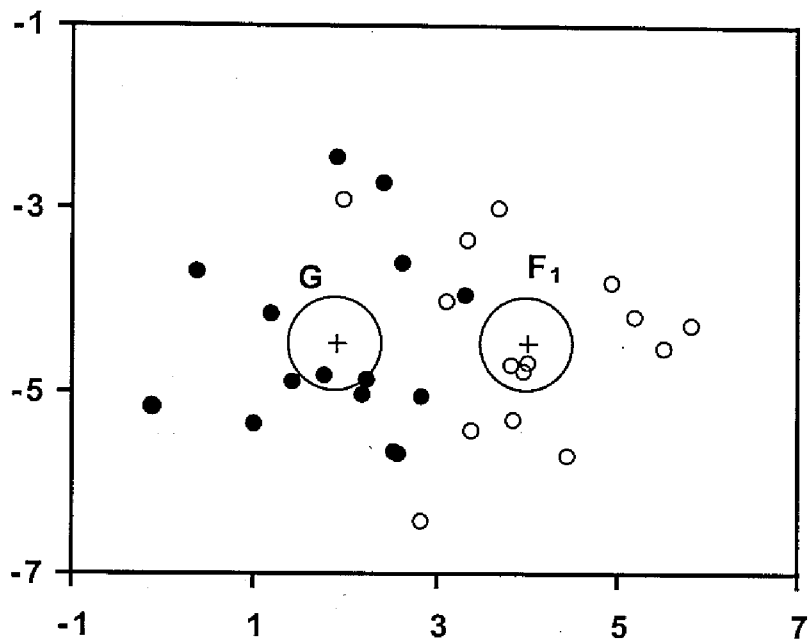


Fig. 32. Linear Discriminant Analysis Using 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 16:3, br-17:0, 18:0 in the Leaf of Seedlings of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F₁ in Three Families.

• and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F₁, respectively. The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

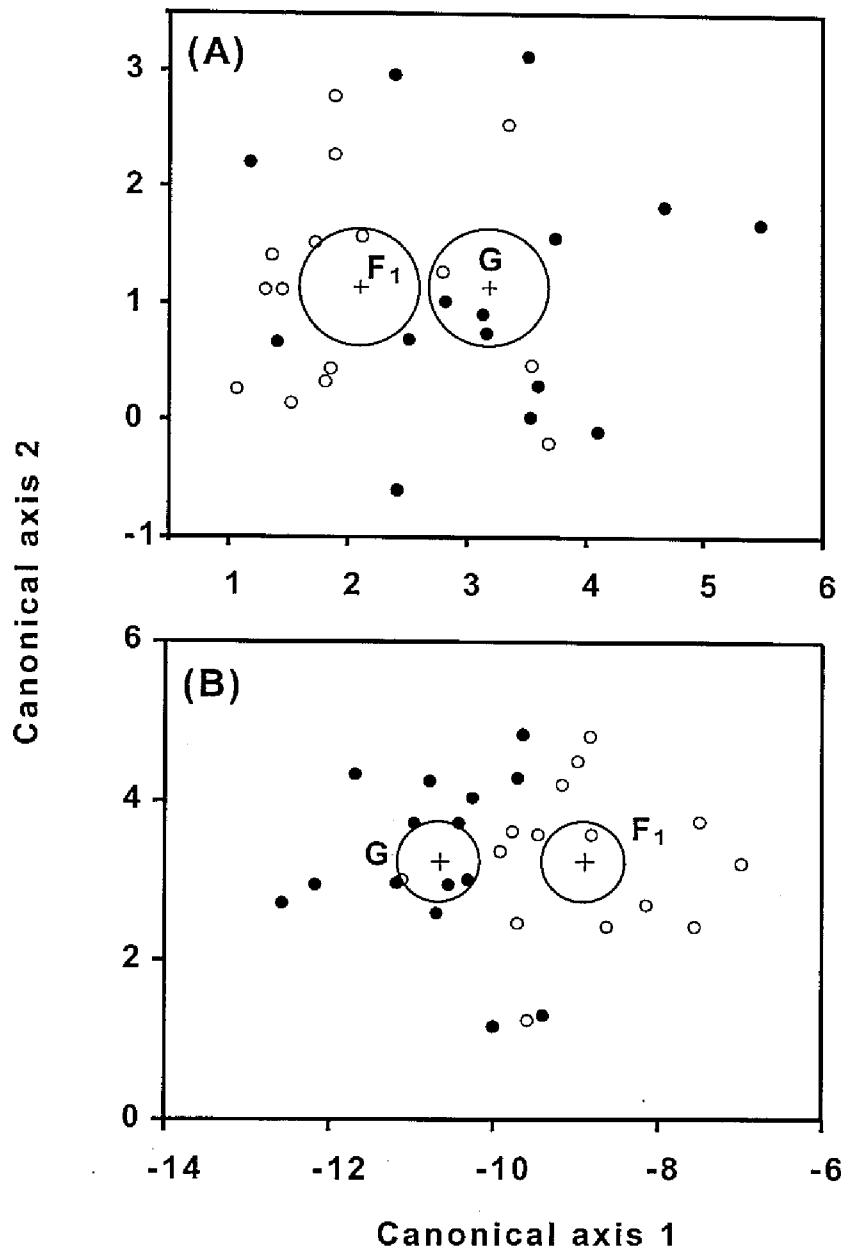


Fig. 33. Linear Discriminant Analysis by Diterpene (Larixol, 13-Epitorulosyl Acetate, Isopimaric Acid, Abietic Acid, Dehydroabietic Acid, Neoabietic Acid) Contents (A) and Fatty Acid (16:0, 16:1, br-17:0, 18:1, 18:2, 18:3) Compositions (B) in the Leaf of Seedlings of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F_1 in Three Families.

• and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and F_1 , respectively.

The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

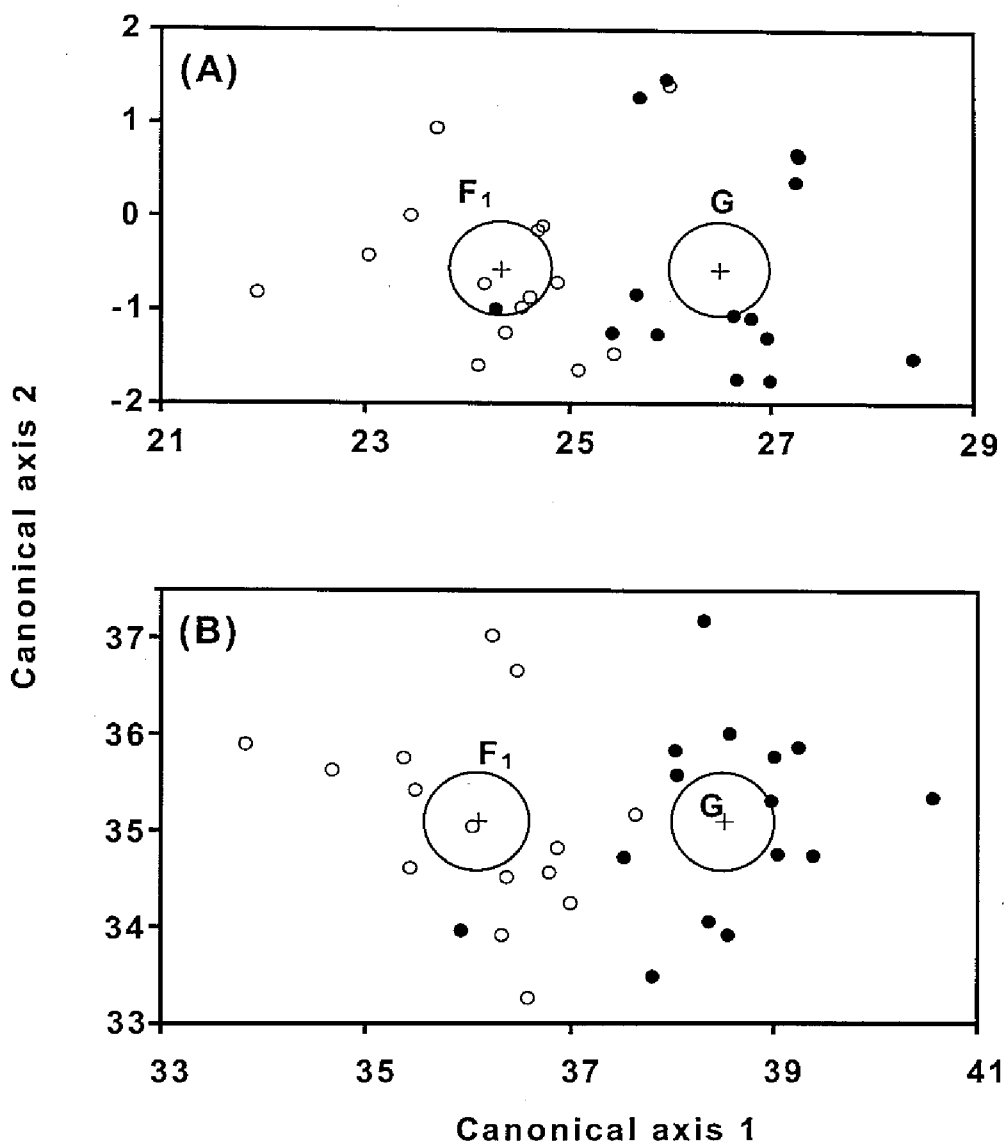


Fig. 34. Linear Discriminant Analysis by 16:0, br-17:0, 18:3, Larixol, Abietic Acid (A) and 16:0, br-17:0, 18:3, Larixol, Isopimaric Acid, Abietic Acid Compositions (B) in the Leaf of Seedlings of *L. gmelinii* var. *japonica* and the F₁ in Three Families.

• and ○ indicate *L. gmelinii* var. *japonica* (G) and the F₁, respectively.

The large circles show the 95% confidence intervals of the multivariate means.

い成分を選択することによっても雑種判別は可能であると考えられた。

最近、葉を直接、近赤外分光光度計で分析することによりカロテノイドの分布^{107, 108)} やモノテルペンである 1, 8-cineole の含有量¹⁰⁹⁾ を分析することができることが報告されている。また、近赤外分光法により、ワイン中の低分子脂肪酸及びモノテルペンアルコールの分析¹¹⁰⁾ や油脂中の脂肪酸 (18:0, 18:1, 18:2, 18:3) 組成の推測¹¹¹⁾ が可能なことが報告されており、F₁ 種苗の判別への利用が期待される。

本研究では、グイマツ、カラマツ及び F₁ について樹皮のジテルペン及び葉のジテルペンと脂肪酸組成を明らかにし、さらにそれらを基に線形判別分析することにより、グイマツと F₁ 種苗の判別が可能なことを示した。このことは、これらの樹種のジテルペンと脂肪酸生合成が遺伝的に制御されているために樹種の特徴へ反映し、判別が可能であると考えられる。家系や亜種間におけるこれらの組成の違いや、生育地域や季節変動などの環境要因が組成に及ぼす影響については、今後更なる研究が必要と考えられる。

1997 年に開催された COP3 (地球温暖化防止京都会議) において採択された京都議定書では、日本は 1990 年に対する 2008 年から 2012 年の 5 年間の温室効果ガス平均排出量を 6%削減しなければならず、そのうち 3.8%を森林により吸収することとしている。一方、日本国内の人工造林面積は、林業の採算性の低迷による経営意欲の減退、林業労働力の減少などから減少傾向にある¹¹²⁾。北海道では、近年の道産材の需要の高まりから伐採量が増大し、2001 年～2006 年の 5 年間に皆伐面積がほぼ倍増 (5160～10238 ha) しているものの、人工造林面積は 6,000～7,000 ha と低迷しており、伐採量に造林量が追いつかない状況である¹³⁻¹⁴⁾。今後は、温室効果ガス削減に向けて積極的に植林が進むと考えられ、炭素固定能の優れた F₁ 家系の選抜も行われていることから²⁰⁻²¹⁾、F₁ 種

苗の需要が高まることが予想される。その需要に応えるためにも、本研究成果を活用した近赤外分光光度法などの新たな F₁ 種苗の判別法の開発が期待される。

VI. 参考文献

- 1) Farjon, A., "Pinaceae: drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*", Koeltz Scientific Books, Königstein, pp. 193-219 (1990).
- 2) Hoshi, H., Forest tree genetic resources conservation stands of Japanese larch (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.). *For. Tree Gen. Res. Inf.*, Special Issue No.1, 1-4 (2004).
- 3) 上田明一, 樋口輔三郎, 五十嵐文吉, 前田 満, 桑畑 勤, 太田嘉四夫, 阿部 永, 藤巻裕蔵, 藤倉仁郎, 高安知彦, エゾヤチネズミ研究史. 林業試験場研究報告, 191, 1-100 (1966).
- 4) Kaneko, Y., Nakata, K., Saitoh, T., Stenseth, N. C., and Bjørnstad, O. N., The biology of the vole *Clethrionomys rufocanus*: a review. *Res. Popul. Ecol.*, 40, 21-37 (1998).
- 5) 北海道水産林務部: 平成 9 年度 北海道林業統計, pp. 132-133, 平成 10 年 12 月.
- 6) 北海道水産林務部: 平成 10 年度 北海道林業統計, pp. 130-131, 平成 11 年 12 月.
- 7) 北海道水産林務部: 平成 11 年度 北海道林業統計, pp. 124-125, 平成 12 年 12 月.
- 8) 北海道水産林務部: 平成 12 年度 北海道林業統計, pp. 124-125, 平成 13 年 12 月.

- 9) 北海道水産林務部: 平成 13 年度 北海道林業統計, pp. 124-125, 平成 14 年 12 月.
- 10) 北海道水産林務部: 平成 14 年度 北海道林業統計, pp. 124-125, 平成 15 年 12 月.
- 11) 北海道水産林務部: 平成 15 年度 北海道林業統計, pp. 124-125, 平成 16 年 12 月.
- 12) 北海道水産林務部: 平成 16 年度 北海道林業統計, pp. 58-65, 平成 17 年 12 月.
- 13) 北海道水産林務部: 平成 17 年度 北海道林業統計, pp. 57-64, 平成 18 年 12 月.
- 14) 北海道水産林務部: 平成 18 年度 北海道林業統計, pp. 57-64, 平成 19 年 12 月.
- 15) 藤本高明, 安久津 久, 来田和人, 内山和子, 黒丸 亮, グイマツ雑種F₁家系における密度の変異. 第54回日本木材学会大会研究発表要旨集, 519 (2004).
- 16) 高橋延清, 西口親雄, 林木の耐鼠性に関する研究 (2) 雑種カラマツF₁苗にたいするエゾヤチネズミの接触嗜好性. 東大演報, 62, 173-188 (1966).
- 17) 福地 稔, 野外でのカラマツ類の耐鼠性比較. 第98回日本林学会大会論文集, 98, 257-258 (1987).
- 18) 大島紹郎, 島山末吉, 久保田泰則, 各世代のカラマツ雑種の特性 (I) - グイマツ×ニホンカラマツ雑種F₁およびその複交配種 -. 第85回日本林学会大会講演集, 169-171 (1974).
- 19) 梶 勝次, 島山末吉, 藤谷光紀, 各世代のカラマツ雑種の特性 (II) - グイマツ×ニホンカラマツ雑種F₁およびその戻し交配種 -. 第85回日本林学会大

- 会講演集, 172-173 (1974).
- 20) 来田和人, 藤本高明, 内山和子, 黒丸 亮, 高CO₂吸収家系選抜に向けた31年生グイマツ雑種F₁の評価. 第116回日本森林学会大会講演要旨集, 103 (2005).
 - 21) 来田和人, 黒丸 亮, 内山和子, 炭素固定量に対するグイマツ雑種F₁家系選抜の効果. 第117回日本森林学会大会講演要旨集, 104 (2006).
 - 22) 森口喜成, 来田和人, 内山和子, 黒丸 亮, 戸丸信弘, 津村義彦, 分子マーカーを用いたグイマツ×カラマツ採種園における雑種種苗の識別法. 第116回日本森林学会大会講演要旨集, 100 (2005).
 - 23) Moriguchi, Y., Kita, K., Uchiyama, K., Kuromaru, M., and Tsumura, Y., Enhanced hybridization rates in a *Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* interspecific seed orchard with a single maternal clone revealed by cytoplasmic DNA markers. *Tree Genetics & Genomes*, 4, 637-645 (2008).
 - 24) 来田和人, 内山和子, 森口喜成, 高垣和士, 齊藤陽子, 井出雄二, 津村義彦, 黒丸 亮, DNAマーカーによる雑種苗木判定方法の検証. 第118回日本森林学会大会講演要旨集, 384 (2007).
 - 25) 後藤 晋, 育種現場におけるDNAマーカーの利用可能性—採種園管理を中心として—. 北海道の林木育種, 46 (1), 1-4 (2003).
 - 26) 西口親雄, 有沢 浩, 飯塚徳義, 林木の耐鼠性に関する研究 (IV) グイマツのエゾヤチネズミに対する喫食抵抗性に関与する化学成分. 日林誌, 59, 167-172 (1977).
 - 27) 林 英司, 飯塚和也, 河野耕蔵, カラマツ類交雑家系における樹皮エーテル抽出物の量的変異. 日本林学会大会論文集, 43, 10-12 (1995).

- 28) Hayashi, E., Iizuka, K., Sukeno, S., and Kohno, K., Relationship between resistance to vole browsing and content of ether extract in the bark of larch species and hybrids. *J. For. Res.*, 3, 119-122 (1998).
- 29) 助野真一, 永田義明, カラマツ属耐鼠性成分の検索と早期検定への応用Ⅱ. 樹皮抽出成分の季節および枝齡による変動. 第106回日本林学会大会講演要旨集, 523 (1995).
- 30) 助野真一, 小澤修二, カラマツ属耐鼠性成分の検索と早期検定への応用Ⅲ. 耐鼠性成分の同定. 第108回日本林学会大会講演要旨集, 198 (1997).
- 31) 関 一人, 斎藤直人, 中田圭亮, 雲野 明, 中高齡カラマツ林における野ネズミ被害と樹皮抽出成分との関連. 第110回日本林学会大会学術講演集, 1, 123-124, (1999).
- 32) 関 一人, 斎藤直人, 佐藤真由美, 大島紹郎, 中田圭亮, カラマツおよびグイマツの種内・種間交配家系における樹皮中のジテルペノイド. 第54回日本木材学会大会研究発表要旨集, 675 (2004).
- 33) Yasue, M., Ogiyama, K., Suto, S., Tsukahara, H., Miyahara, F., and Ohba, K., Geographical differentiation of Natural cryptomeria stands analyzed by diterpene hydrocarbon constituents of individual trees. *J. Jpn. For. Soc.*, 69, 152-156 (1987).
- 34) Hanari, N., Yamamoto, H., and Kuroda, K., Distinction of resin compounds between the healthy bark and the resinous stem canker of *Thujopsis dolabrata* var. *hondae*. *J. Wood Sci.*, 49, 548-552 (2003).
- 35) Arrabal, C., Cortijo, M., Fernandez de Simon, B., Garcia-Vallejo, M. C., and Cadahia, E., *Pinus pinaster* oleoresin in plus trees. *Holzforschung*, 56, 261-266 (2002).

- 36) Gallis, A. T., and Panetsos, P., Use of cortical terpenes to discriminate *Pinus brutia* (Ten.), *Pinus halepensis* (Mill.) and their hybrids. *Silvae Gen.*, 46, 2-3 (1997).
- 37) Sato, M., Seki, K., Kita, K., Moriguchi, Y., Hashimoto, M., Yunoki, K., and Ohnishi, M., Comparative analysis of diterpene composition in the bark of the hybrid larch F₁, *Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* and their Parent Trees, *J. Wood Sci.*, in press.
- 38) Sato, M., Seki, K., Kita, K., Moriguchi, Y., Yunoki, K., Kofujita, H., and Ohnishi, M., Prominent differences in leaf fatty acid composition in the F₁ hybrid compared with parent trees *Larix gmelinii* var. *japonica* and *L. kaempferi*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
- 39) Sato, M., Saito, N., Seki, K., Nishikoori, M., Tokuji, Y., and Ohnishi, M., Effects of exogenous mevalonic acid on sterol lipid classes in *Larix kaempferi* callus. *Journal of Oleo Science*, 56, 25-28 (2007).
- 40) Croteau, R., and Johnson, M. A., Biosynthesis of terpenoid wood extractives. In "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components", eds. Higuchi, T., Academic Press, Orlando. pp. 379-439 (1985).
- 41) Petit, R. J., Demesure, B., and Dumolin, S., cpDNA and mtDNA primers in plants. In "Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals", eds. Karp, A., Isaac, P. G., Ingram, D., Chapman and Hall, London, pp. 256-261 (1998).
- 42) Murray, M., and Thompson, W. F., Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325 (1980).
- 43) Hansson, L., Gref, R., Lundren, L., and Theander, O., Susceptibility to

- vole attacks due to bark phenols and terpenes in *Pinus contorta* provenances introduced into sweden. *J. Chem. Ecol.*, 12, 1569-1578 (1986).
- 44) Neale, D. B., Sederoff, R. R., Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 212-216 (1989).
- 45) Sutton, B. C. S., Flanagan, D. J., Gawley, J. R., Newton, C. H., Lester, D. T., El-Kassaby, Y. A., Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones. *Theor. Appl. Genet.*, 82, 242-248 (1991).
- 46) Hipkins, V. D., Krutovskii, K. V., Strauss, S. H., Organelle genomes in conifers: structure, evolution, and diversity. *For. Genet.*, 1, 179-189 (1994).
- 47) Chen, J., Tauer, C. G., Huang, Y., Paternal chloroplast inheritance patterns in pine hybrids detected with *trnL-trnF* intergenic region polymorphism. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1307-1311 (2002).
- 48) Bol'shakova, V. I., Khan, V. A., Dubovenko, Zh. V., Shmidt, E. N., and Pentegova, V. A., Terpenoids of oleoresin of larch growing in Kamchatka. *Khim. Prir. Soedin.*, 3, 340-343 (1980).
- 49) Bol'shakova, V. I., Demenkova, L. I., Khan, V. A., Dubovenko, Zh. V., Shmidt, E. N., and Pentegova, V. A., Chemical composition of the oleoresin of *Larix kamtschatica*. *Khim. Prir. Soedin.*, 6, 790-793 (1985).
- 50) Bol'shakova, V. I., Khan, V. A., Dubovenko, Zh. V., Shmidt, E. N., Pentegova, V. A., and Shmidt, E. N., Terpenoids of the oleoresin of *Larix*

- leptolepis*. *Khim. Prir. Soedin.*, 6, 839 (1985).
- 51) Bol'shakova, V. I., Shmidt, E. N., Pentegova, V. A., and Mamatyuk, V. I., Minor compounds of the oleoresin of the Kamchatka, Japanese, and Siberian larches. *Khim. Prir. Soedin.*, 5, 571-576 (1986).
- 52) Chernenko, G. F., and Shmidt, E. N., Neutral extractive substances from the bark of *Larix sibirica*. *Khim. Prir. Soedin.*, 6, 833-834 (1990).
- 53) Chernenko, G. F., Ivanova, E. E., Demenkova, L. I., and Shmidt, E. N., Extractive substances in the bark of *Larix dahurica*. *Khim. Prir. Soedin.*, 4, 580-582 (1991).
- 54) D'yachenko, L. G., Roshchin, V. I., and Kovalev, V. E., Neutral compounds of the extractive substances of *Larix gmelinii*. *Khim. Prir. Soedin.*, 1, 56-63 (1986).
- 55) Mills, J. S., Diterpenes of *Larix* oleoresins. *Phytochemistry*, 12, 2407-2412 (1973).
- 56) 大島紹郎, グイマツ×ニホンカラマツ雑種F₂世代の特性—耐兔性、耐鼠性、先枯病抵抗性および生長—。第98回日本林学会大会論文集, 255-256 (1987).
- 57) Roughan, P. G., and Slack, C. R., Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33, 97-132 (1982).
- 58) Wallis, J. G., and Browse, J., Mutant of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.*, 41, 254-278 (2002).
- 59) Andrews, J. E., and Ohlrogge, J., Fatty acid and lipid biosynthesis and degradation. In "Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology", eds. Dennis, D. T., and Turpin, D. H., Longman Scientific & Technical,

- Essex, England, pp. 339-352. (1990).
- 60) Sperling, P., and Heinz, E., Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1632, 1-15 (2003).
 - 61) Mongrand, S., Bessoule, J. J., Cabantous, F., and Cassagne, C., The C_{16:3}/C_{18:3} fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry*, 49, 1049-1064 (1998).
 - 62) Mongrand, S., Badocb, A., Patouillec, B., Lacomblezc, C., Chaventic, M., Cassagne, C., and Bessoulea, J., Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition. *Phytochemistry*, 58, 101-115 (2001).
 - 63) Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).
 - 64) Jamieson, G. R., and Reid, E. H., The leaf lipids of some conifer species. *Phytochemistry*, 11, 269-275 (1972).
 - 65) Browse, J., and Somerville, C., Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 467-506 (1991).
 - 66) Holzla, G., and Dormann, P., Structure and function of glycolycerolipids in plants and bacteria. *Prog. Lipid Res.*, 46, 225-243 (2007).
 - 67) Dyas, L., and Goad, L. J., Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry*, 34, 17-29 (1993).
 - 68) Kemp, R. J., Goad, L. J., and Mercer, E. I., Changes in the levels and

- composition of the esterified and unesterified sterols of maize seedlings during germination. *Phytochemistry*, 6, 1609-1615 (1967).
- 69) Atallah, A. M., Aexel, R. T., Ramsey, R. B., Threlkeld, S., and Nicholas, H. J., Translocation of sitosterol and related compounds in *Pelargonium hortorum* and *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 14, 1927-1932 (1975).
- 70) Atallah, A. M., and Nicholas, H. J., Function of steryl esters in plants: a hypothesis that liquid crystalline properties of some steryl esters may be significant in plant sterol metabolism. *Lipids*, 9, 613-622 (1973).
- 71) Kemp, R. J., Hammam, A. S. A., Goad, L. J., and Goodwin, T. W., Studies on phytosterol biosynthesis: observations on the esterified sterols of higher plants. *Phytochemistry*, 7, 447-450 (1968).
- 72) Schaller, H., Maillot-Vernier, P., Belliard, G., and Benveniste, P., Increased sterol biosynthesis in tobacco calli resistant to a triazole herbicide which inhibits demethylation of 14 α -methyl sterols. *Planta*, 187, 315-321 (1992).
- 73) Whitaker, B. D., Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry*, 27, 3411-3416 (1988).
- 74) Lalaguna, F., and Agudo, M., Changes in the steryl lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Phytochemistry*, 28, 2059-2062 (1989).
- 75) Baker, E. A., Bukovac, M. J., and Flore, J. A., Ontogenetic variations in the composition of peach leaf wax. *Phytochemistry*, 18, 781-784 (1979).
- 76) Grunwald, C., Steroids. In "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series,

- vol. 8, Secondary Plant Products”, eds. Bell, E. A., and Charlwood, B. V., Springer-Verlag, Berlin, pp. 221-256 (1980).
- 77) 錦織正智, カラマツ属の成木シュート頂と成熟胚からの苗条原基誘導. 北海道林業試験場研究報告, 36, 11-20 (1999).
- 78) Schenk, R. V., and Hildebrandt, A. C., Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can. J. Bot.*, 50, 199-204 (1972).
- 79) Dyas, L., Prescott, M. C., Evershed, R. P., and Goad, L. J., Steryl esters in a cell suspension culture of celery (*Apium graveolens*). *Lipids*, 26, 536-541 (1991).
- 80) Wilkinson, S. C., Powls, R., and Goad, L. J., The effects of excess exogenous mevalonic acid on sterol and steryl ester biosynthesis in celery (*Apium graveolens*) cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 37, 1031-1035 (1994).
- 81) Mudd, J. B., and McManus, T. T., Effect of steryl glycosides on the phase transition of dipalmitoyl lecithin. *Plant Physiol.*, 65, 78-80 (1980).
- 82) 高橋延清, カラマツ類の育種. 第73回日本林学会大会講演集, 1-15 (1962).
- 83) 横沢良憲, 村井三郎, 欧州カラマツ、日本カラマツおよび合の子カラマツにおける枝枯病(*Phyalospora laricina* SAWADA)の罹病状況について. 第68回日本林学会大会講演集, 254-256 (1958).
- 84) 柳沢聡雄, 斉藤幹夫, カラマツさき枯病に対する耐病性. 北海道の林木育種, 3(1), 25-29 (1960).
- 85) 佐藤邦彦, 横沢良憲, 庄司次男, カラマツ属各樹種の落葉病と先枯病に対する耐病性. 第72回日本林学会大会講演集, 301-303 (1962).

- 86) 千葉 茂, 永田義明, カラマツ属の育種に関する研究 (2) 落葉病、先枯病に対する樹種間の差異. 日本林学会北海道支部講演集, 12, 114-119 (1963).
- 87) 小口健夫, カラマツ 3 種の生長と先枯病に対する罹病期間. 北海道林業試験場報告, 8, 35-40 (1970).
- 88) 芳賀良一, 野鼠のカラマツ属に対する嗜好の實驗生態學的研究: 特に第一代雜種カラマツの耐鼠性に就いて. 北海道大學農學部邦文紀要, 1, 483-489 (1953).
- 89) 千葉 茂, カラマツ属の育種に関する研究(1) 野兎鼠害に対する樹種間の差異. 日本林学会北海道支部講演集, 12, 109-114 (1963).
- 90) 小笠原繁男, 高橋延清, 倉橋昭夫, 浜谷稔夫, グイマツとカラマツの雜種各種の耐鼠性. 日本林学会北海道支部講演集, 22, 115-121 (1973).
- 91) 畠山末吉ほか: 北海道における林木育種と森林遺傳資源, 北海道林木育種協会編, 林木育種協会, 江別, 2008, pp. 40-42.
- 92) 宮木雅美, ハイブリッドカラマツの特性と改良. 北海道の林木育種, 33 (1), 7-12 (1990).
- 93) 来田和人, グイマツ雜種F₁のブランドさし木苗による新たな用材生産戦略. 第38回 林業技術シンポジウム「新しい木の時代」－森の資源を活かす－, 9-15 (2005).
- 94) 三浦 剛, 尾崎幸洋, 拡がりはじめた近赤外分光分析の応用. 化学工業, 41, 506-514 (1990).
- 95) 佐藤朋覚, 熊谷昌則, 天野敏男, 小川信明, ケモメトリックスを用いるポータブル近赤外分光分析装置による清酒の分類. 分析化学, 52, 653-660 (2003).
- 96) 藤本高明, 土川 覚, 広域非接触型FT-NIR分光光度計による木材の非破壊

- 的強度推定. 第57回日本木材学会大会研究発表要旨集, 94 (2007).
- 97) 木佐貫博光, 倉橋昭夫, 産地の緯度がカラマツ属樹種の実生苗の分枝性、成長、フェノロジー特性に及ぼす影響. 東京大学農学部演習林報告, 102, 93-102 (1999).
- 98) 助野真一, 永田義明, 戸巻邦男, カラマツ属耐鼠性成分の検索と早期検定への応用 I. 耐鼠性と樹皮抽出成分との関連. 第106回日本林学会大会講演要旨集, 522 (1995).
- 99) Steele, C. L., Lewinsohn, E., and Croteau, R., Induced oleoresin biosynthesis in grand fir as a defense against bark beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 4164-4168 (1995).
- 100) Steele, C. L., Katoh, S., Bohlmann, J., and Croteau, R., Regulation of oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*). Differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase genes in response to wounding. *Plant Physiol.*, 116, 1497-1504 (1998).
- 101) Tomlin, E. S., Antonejevic, E., Alfaro, R. I., and Borden, J. H., Changes in volatile terpene and diterpene resin acid composition of resistant and susceptible white spruce leaders exposed to simulated white pine weevil damage. *Tree Physiol.*, 20, 1087-1095 (2000).
- 102) Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J., and Bohlmann, J., Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.*, 129, 1003-1018 (2002).
- 103) Huber, D. P. W., Philippe, R. N., Madilao, L. L., Sturrock, R. N., and Bohlmann, J., Changes in anatomy and terpene chemistry in roots of

- Douglas-fir seedlings following treatment with methyl jasmonate. *Tree physiol.*, 25, 1075-1083 (2005).
- 104) Jasiński, M., Stukkens, Y., Degand, H., Purnelle, B., Marchand-Brynaert, J., and Boutry, M., A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell*, 13, 1095-1107 (2001).
- 105) Campbell, E. J., Schenk, P. M., Kazan, K., Penninckx, I. A. M. A., Anderson, J. P., Maclean, D. J., Cammue, B. P. A., Ebert, P. R., and Manners, J. M., Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in arabidopsis. *Plant Physiol.*, 133, 1272-1284 (2003).
- 106) Grec, S., Vanham, D., Ribaucourt, J. C., Purnelle, B., and Boutry, M., Identification of regulatory sequence elements within the transcription promoter region of *NpABC1*, a gene encoding a plant ABC transporter induced by diterpenes. *Plant J.*, 35, 237-250 (2003).
- 107) Schulz, H., Baranska, M., and Baranski, R., Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers*, 77, 212-221 (2005).
- 108) Baranski, R., Baranska, M., and Schulz, H., Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. *Planta*, 222, 448-457 (2005).
- 109) Schimleck, L. R., Doran, J. C., and Rimbawanto, A., Near infrared

- spectroscopy for cost effective screening of foliar oil characteristics in a *Melaleuca cajuputi* breeding population. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2433-2437 (2003).
- 110) Smyth, H. E., Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Sefton, M., and Gishen, M., Near infrared spectroscopy as a rapid tool to measure volatile aroma compounds in Riesling wine: possibilities and limits. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 1911-1916 (2008).
- 111) Sato, T., New estimation method for fatty acid composition in oil using near infrared spectroscopy. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 2543-2548 (2002).
- 112) 北海道水産林務部総務課: 平成18年度北海道森林づくり白書, 26-41, 平成19年6月.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり熱心なご指導を賜りました帯広畜産大学畜産科学科教授 大西正男先生に厚く御礼申し上げます。

データの取得に際して時間を惜しまずにご協力を下さいました帯広畜産大学産学官連携研究員 柚木恵太博士をはじめ、畜産科学科 食品・生物機能化学研究室の大学院生・学部学生の皆様に感謝申し上げます。

本論文の審査をお引き受け下さいました山形大学農学部教授 貫名 学先生、岩手大学農学部 准教授 小藤田久義先生、帯広畜産大学畜産科学科講師 木下幹朗先生には謹んで感謝申し上げます。また、本研究にご助言を賜りました帯広畜産大学畜産科学科教授 橋本 誠先生、帯広畜産大学畜産科学科助教 得字圭彦先生、帯広畜産大学地域共同研究センター産学官連携教授 田中一郎先生には謹んで感謝申し上げます。

貴重な試料を提供して下さいました北海道立林業試験場 林業経営部育種科 来田和人科長、本研究にご助言を賜りました森林総合研究所 森口喜成博士に感謝申し上げます。

最後に、本研究を行う機会を与えて下さいました北海道立林産試験場 利用部成分利用科 関 一人科長、北海道立林産試験場での業務と学生の両立をご支援下さいました岸野正典研究主任をはじめ、北海道立林産試験場の皆様には深く感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は JST 地域イノベーション創出総合支援事業平成 18 年度シーズ発掘試験の助成を受けて行いました。ここに記して感謝申し上げます。