

シダ類の化学とケモタキソノミー (第97報) 1) フモトシダの成分変異について その3

田中信壽^{a,*}, 和田浩志^a, 大道寺香澄^a, 瀧野裕之^a, 中藤成実^b

^a東京理科大学薬学部, ^b東京都立国分寺高校

Chemical and Chemotaxonomical Studies of Ferns. XCVII. 1) Constituent Variation of *Microlepia marginata* (3)

NOBUTOSHI TANAKA,^{a,*} HIROSHI WADA,^a KASUMI DAIDOUJI,^a HIROYUKI FUCHINO,^a
and NARUMI NAKATO^b

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, Funakawara-machi, Ichigaya, Shinjuku-ku,
Tokyo 162, Japan, ^bKokubunji High School, 3-2-5 Shin-machi, Kokubunji-shi, Tokyo 185, Japan

(Received June 26, 1997)

There grow five chemotypes of *Microlepia marginata* in Japan. M-type strain containing microlepin and/or 4-epimicrolepin, a predominant strain, is found all over the habitat, and F-type strain containing a flavonoid, fumotonaringin, and M-F-type strain containing microlepins and fumotonaringin are in the south-west areas of Japan and never on the Japan sea side where snow is deep in winter. P-type strain containing fumotoshidin A and fumotoshidin arabinoside, and Y-type strain containing marginatosides A and B are rather rare but found in all the areas, though P-type strain is more common in the Hokuriku and San-in districts and Y-type strain in the Shikoku and the south-west of Kyusyu. Of *M. marginata* growing in Japan, 61% is of M-type, 13% of M-F-type, 9% of F-type, 4% of Y-type and 13% of P-type. As regards the chromosome numbers, all the chemotypes were shown to be tetraploid, with the chromosome number of 168. A rare example of hexaploid, with the chromosome number of 252, was found among the M-F-type plants, showing that the constituent variation is independent of the chromosome numbers.

M. marginata var. *bipinnata* and *M. pseudo-strigosa* were also tested for their constituents. They were found to show TLC profiles similar to that of M-type strain and also indicated the presence of cyanogenic glycosides, the main constituents of *M. strigosa*, on Feigl-Anger test.

Keywords ----- *Microlepia marginata* ; chemotype ; *Microlepia pseudo-strigosa* ;
Microlepia marginata var. *bipinnata* ; chromosome number ; distribution

フモトシダ *Microlepia marginata* (PANZER) C.
CHR. は、関東、北陸以西の温暖な地域に普通に見
られるイノモトソウ科 (Pteridaceae) のシダで、含有
成分に関する変異株が存在する。すなわち、カウラ
ン系ジテルペン配糖体のmicrolepin (1) または4-epi-

microlepin (2) を主成分とするM型株、フラボノイ
ド配糖体のfumotonaringin (5) を主成分とするF型
株、microlepin 類とfumotonaringin の両方を含むM-
F型株、同属のヤンバルフモトシダ *M. hookeriana*
(WALL.) PRESL. の主成分であるhookeroside類に類

似した構造を持つピマラン系ジテルペン配糖体、marginatoside A (3) と B (4) を主成分とする Y 型株、²⁾ fumotoshidin arabinoside (6) と fumotoshidin A (7) のピマラン系化合物を主成分とする P 型株 3) の 5 種が存在する。これらの化合物はシリカゲルの TLC で、互いに異なる R_f 値を与え、10% 硫酸噴霧後の加熱により、それぞれ特徴的な呈色をするので、各変異株の識別は、乾燥葉（羽片 1 枚で充分である）のメタノールエキスを TLC でチェックすることで容易にできる (Fig. 1 参照)。

今回、フモトシダの分布するほぼ全域から合計 1504 個体の葉を採集し、その株型を調査したので、その結果について報告する。また、フモトシダとイシカグマ *M. strigosa* (THUNB.) PR. の交雑種とされているクジャクフモトシダ *M. marginata* var. *bipinnata* MAKINO、クジャクフモトシダの近縁種とされているフモトカグマ *M. pseudo-strigosa* MAKINO についても成分パターンを調べたので、合わせて報告する。

本論

1. フモトシダの成分変異株の分布

フモトシダの分布するほぼ全域から採集した合計 1504 個体の乾燥葉をメタノールで抽出し、シリカゲルの TLC [展開溶媒: CHCl₃-MeOH (5:1)] で含有成分を調べたところ、918 個体 (61%) が M 型株、192 個体 (13%) が M-F 型株、137 個体 (9%) が F 型株、58 個体 (4%) が Y 型株、199 個体 (13%) が P 型株であった。

各変異株の分布図 (Fig. 2) は、便宜上、市町村単位での存在の有無を示し、同じ株の記号が地図上で重なる場合は一方を省略した。M 型株 (●) は全域で見られるが、F 型株 (○) と M-F 型株 (◎) (両株ともフラボノイドを含む) は日本海側には見られない。この分布の偏りは、冬期の積雪に何らかの関連があるのではないかと考えられる。例えば、各株の前葉体の耐寒性の差、早春の食害の有無、などが考えられるが、今のところ確

証はない。フラボノイドの存在意義の一つに、紫外線による障害を防止すること、が挙げられるが、紫外線照射量の差と F 型株、M-F 型株の分布状況に関連づけるのは無理があるように思われる。一方、P 型株 (☆) は日本海側に多く見られ、他の地域でも内陸部に分布する傾向があるので、かなり耐寒性がある株ではないかと思われる。また、Y 型株 (*) は四国と九州の西南部に多く、他の地域でも散見されるが、P 型株と同様、内陸部に分布する傾向がある。

2. 各変異株の形態学上の相違点

本研究には葉のみを採集しているので、根茎に関する形態学上の検討は行っていない。葉形、葉質に関する観察では、同じ M 型株に属する個体間でも変動の幅が大きく、しかも連続性がある。例えば、葉形は Fig. 3 に示すように、細長いものから三角形のものまで見られる。葉の大きさ、羽片の切れ込み、葉面や葉軸の毛の量なども多様であり、他の成分変異株の形質は、この M 型株の変動の幅の中に入るため、成分変異株間で形態学的な相違点を見つけだすことは難しい。唯一、相違が見ら

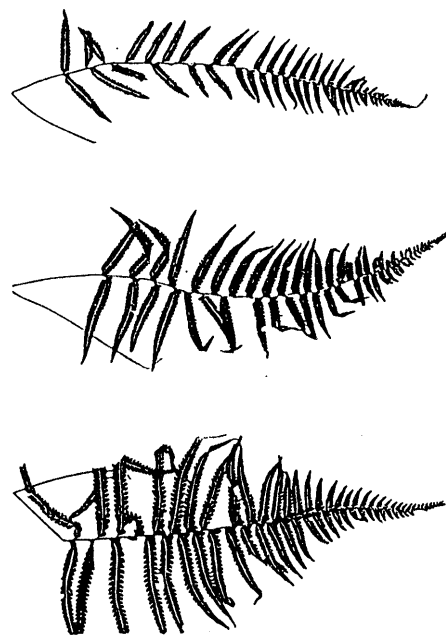


Fig. 3 Morphological Variation of the Fronds of M-type Strain

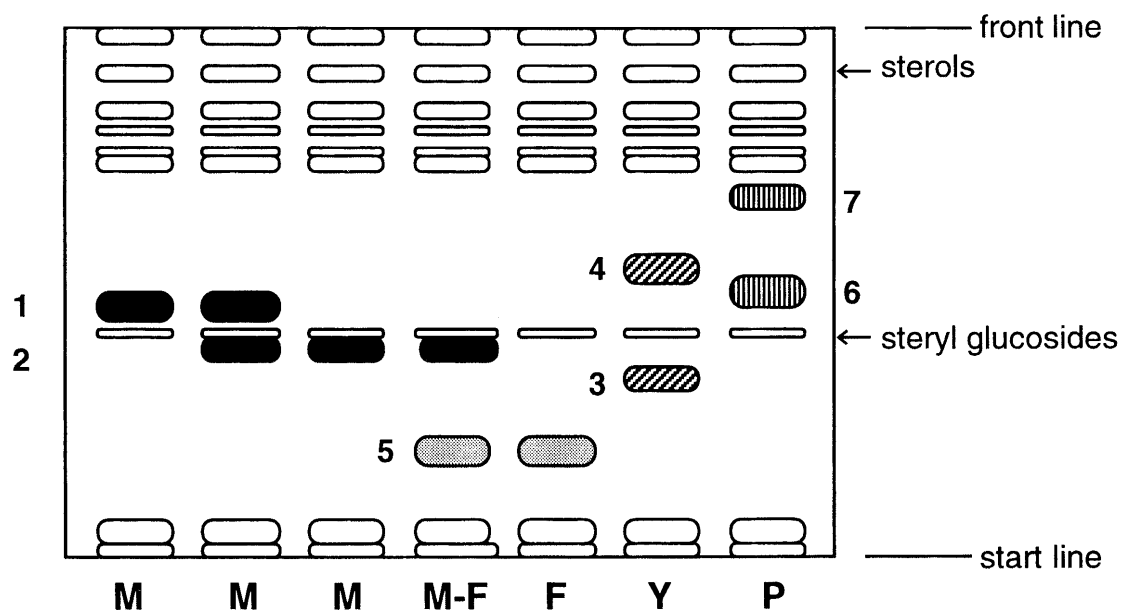
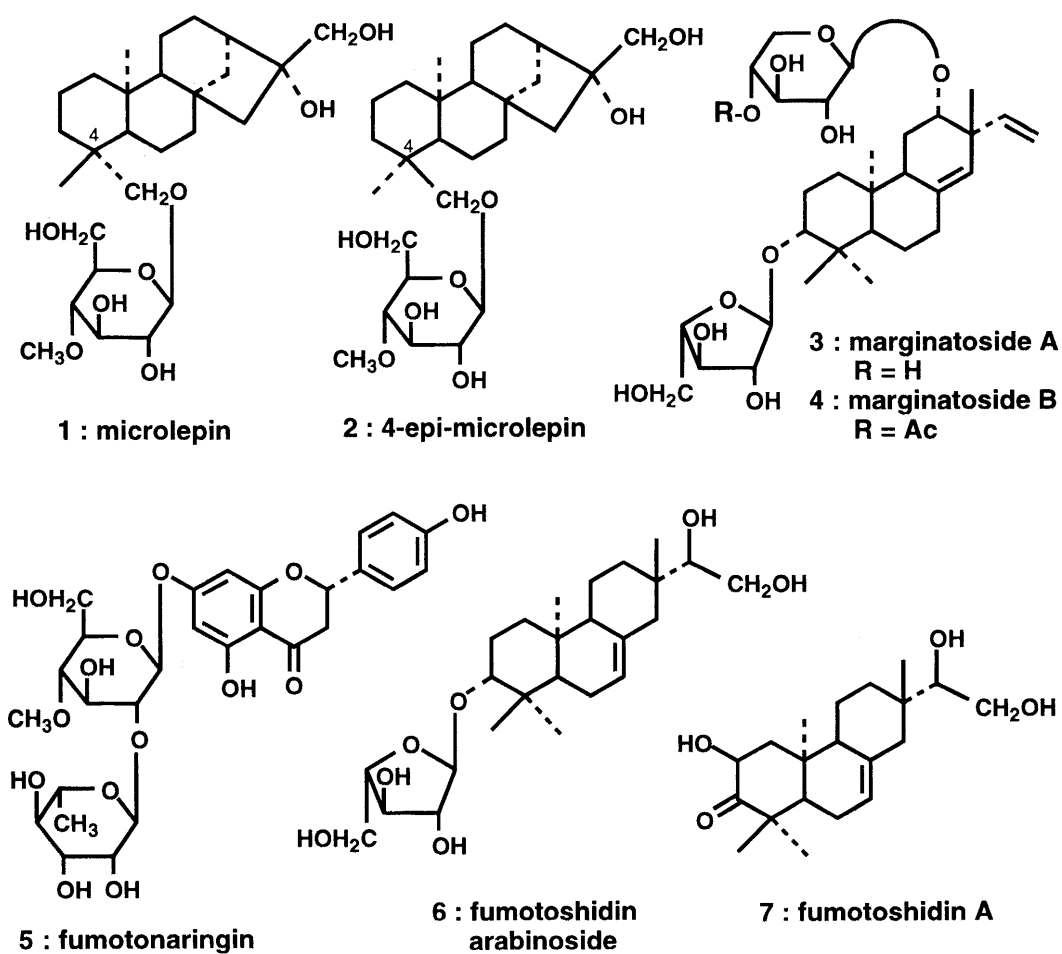


Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of the Methanol Extracts of Five Chemo-types of *M. marginata*
Solvent, CHCl₃ - MeOH (5 : 1).



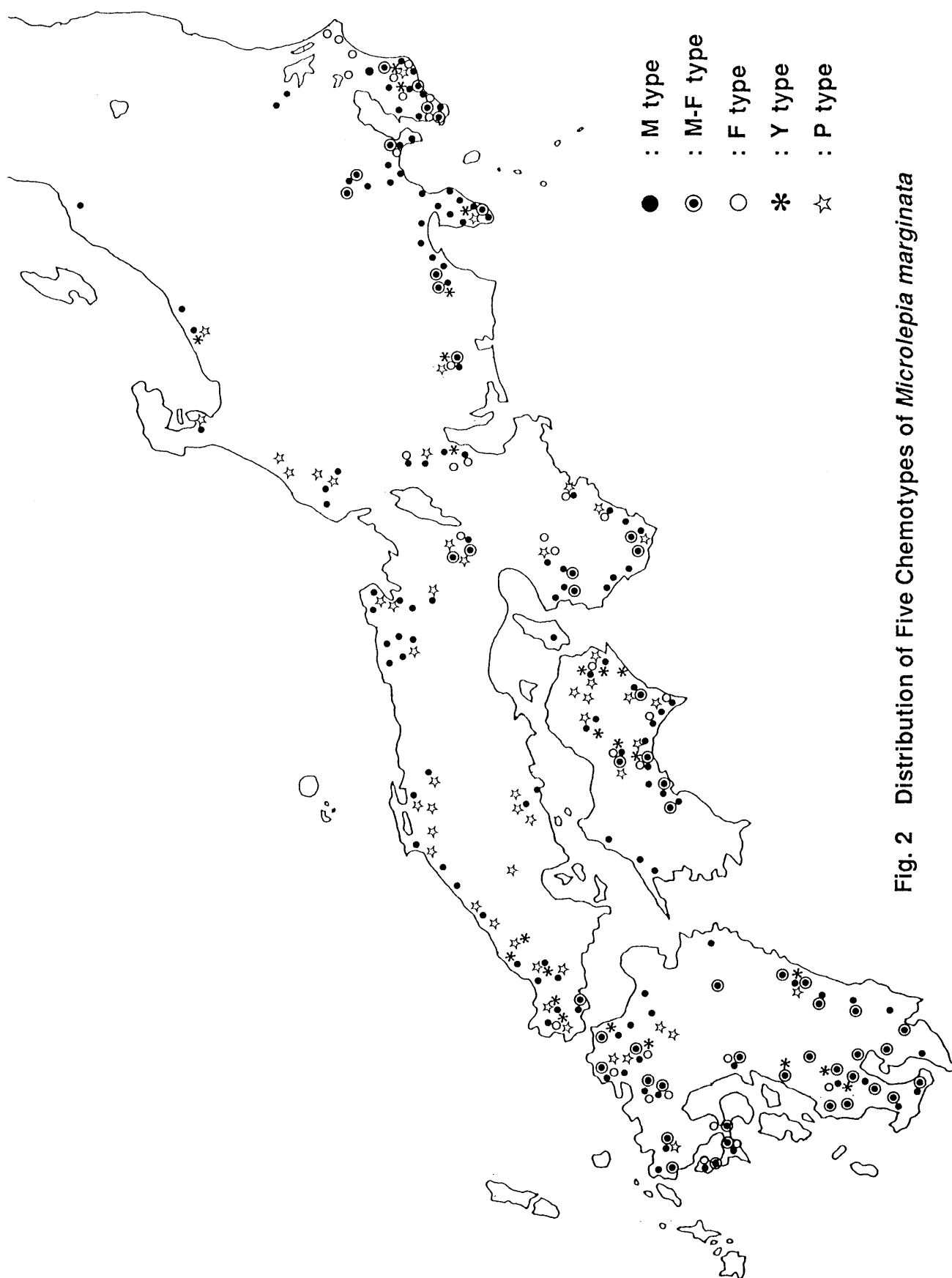


Fig. 2 Distribution of Five Chemotypes of *Microlepidia marginata*



Photo 1. Young Frond of M-type Strain

れたのは、春の芽立ちの葉軸の色で、M型株、M-F型株、F型株は緑色の葉軸を展開させてくるのに対し、P型株、Y型株は赤みを帯びた葉軸を展開させてくる。特にP型株ではこの色調が鮮やかで、M型株などとの相違は一見して明らかである（写真1、2）。この時期の葉軸をメタノールで抽出し、シリカゲルのTLC〔展開溶媒：CHCl₃-MeOH（5：1）〕で調べると、M型株、M-F型株、F型株ではクロロフィルとカロチノイドが顕著であるのに対し、P型株ではこれらが少量しか存在せず、代わりにRf値0.1付近に赤い色素の存在が認められた。Y型株ではこの色素とともに、クロロフィルとカロチノイドがやや多く存在するため、葉軸の赤みはP型株ほど鮮やかではない。この赤い色素は、長波長のUVを照射するとクロロフィルと同じ赤い蛍光を発するので、クロロフィルに関連したポルフィリン系の化合物と思われるが、微量なため、構造決定は行っていない。葉軸の色は、いずれの変異株とも経時的に褐変していくので、夏期においては識別が困難となる。P型株、Y型株の主成分はピマラン系のジテルペンであり、その構造はヤンバルフモトシダ（沖縄から台湾にかけて分布）のものに類似する。⁴⁾ ヤンバルフモトシダの葉軸が赤みを帯びていることも考え合わせると、P型株、Y型株とヤンバルフモトシダは何らかの類縁関係があるものと思われる。

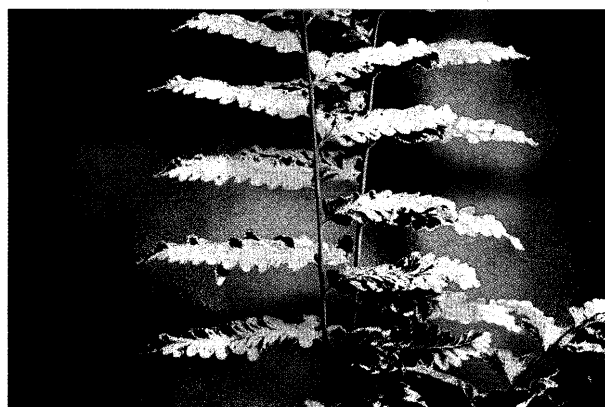


Photo 2. Young Frond of P-type Strain

3. 染色体の倍数性と成分変異との関係

日本産のフモトシダ属の染色体の基本数は42で、フモトシダには4倍体（168）と6倍体（252）の2種の種内倍数体が存在する。⁵⁾ そこで、各成分変異株2個体について染色体数を計測したところ、いずれも、4倍体であった。また、6倍体として確認されている3個体（三浦半島産）についてTLCチェックを行ったところ、いずれもM-F型株であった。このことから、成分変異と倍数性には特に関連がないと言える。

4. 形質の安定性

すべての成分変異株につき、同一条件下で鉢植えにし、5年間観察を行っているが、成分パターンと芽立ちの葉軸の色調は保たれており、これらの形質はかなり安定したものと思われる。

M型株については、通常用の土（黒土、鹿沼土、腐葉土、6：3：1）のほかに、鹿沼土のみの条件と鹿沼土に石灰を3%まぶした条件で鉢植えにし、隔週に液肥（ハイポネックス5-10-5の500倍希釈液）を与えて栽培し、形質の変化を観察した。鹿沼土のみの条件下では根の張りが悪く、葉も弱々しく徒長する傾向が見られたが、microlepin 類の生産は通常のもので変わりがなかった。一方、鹿沼土に石灰をまぶした条件下では、根の張り、葉の生長とも悪く、3年目には枯死する状態であったが、この条件下で生長した葉にはmicrolepin 類がまった

く見られなくなった。これは、二次代謝産物の生産が土壌条件により左右されることがあることを示したものであるが、フモトシダの成分変異に直接関係する要因ではないように思われる。ちなみに、石灰岩地帯（山口県秋芳洞周辺、福岡県平尾台）で採集した株はmicrolepin 類を生産するM型株であった。石灰岩地帯であっても、フモトシダの生育できる場所は、鉢植え実験に見られるような極端な状況ではないようである。

5. クジャクフモトシダの成分

クジャクフモトシダ *M. marginata* var. *bipinnata* はフモトシダとイシカグマ *M. strigosa* の交雑種と言われているシダで、形態学的な特徴も両者の中間にある (Fig. 5)。イシカグマの含有成分はフモトシダとは全く異なり、主成分は青酸配糖体のprunasin 4'-*O*-*p*-coumarate (8) とprunasin 4'-*O*-caffeate (9) で (Fig. 4)、少量のpterosin 類を伴うのみである。6) これらの青酸配糖体の存在は、TLCによる検出では必ずしも明確にできないが、青酸配糖体の定性試験に用いられるFeigl-Anger 試験紙により、容易に確認することができる。7) 通常、青酸配糖体は展開したばかりの若葉に多く存在し、以後、次第に減少して、夏には消滅することが多いが〔例、イヌワラビ、イワヒメワラビ（未発表データ）〕、イシカグマの青酸配糖体の場合、4月から5月にかけて最も含量が高く、以後次第に減少して1/3量程度になるものの、夏場以降も消滅することなく、一年を通じて検出が可能である。また、フモトシダの中では、Feigl-Anger 試験紙に反応する株はいまだ存在しない。

今回、長崎、大分、高知、和歌山、三重、静岡、神奈川の7県にまたがる21地点から65株のクジャクフモトシダの葉を採集し、TLCチェックを行うとともに、Feigl-Anger 試験紙による青酸配糖体の有無を調べた。その結果、すべてのクジャクフモトシダはM型株のTLCパターンを示し、Feigl-Anger 試験紙には陽性であった。これはク

ジャクフモトシダがフモトシダとイシカグマの交雑種であることを成分面から裏付ける結果となっている。イシカグマはフモトシダより耐寒性がなく、千葉県以南の温暖な地域の海岸に近いところに生育し、日本海側には分布していない。イシカグマの分布域ではM型株のフモトシダが優勢であり、その結果、クジャクフモトシダにM型株のパターンが現われたものと思われるが、他の成分変異株との交雑が起こっているかどうかは今のところ不明である。

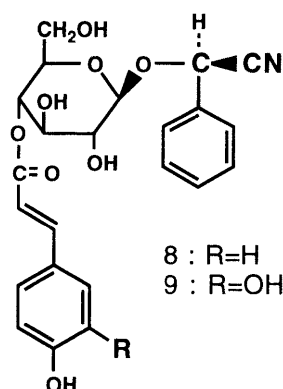


Fig. 4 Constituents of *M. strigosa*

6. フモトカグマの成分

フモトカグマ *M. pseudo-strigosa* は形態的にはクジャクフモトシダに近似するシダであるが、羽片の切れ込みの深さが違うことや、染色体数が252（6倍体）であることから独立した種として扱われている。個体数は少なく、分布域はクジャクフモトシダの北限に近いところにある。今回、千葉、神奈川、静岡の3県の4地点から11株の葉を採集し、そのTLCパターンとFeigl-Anger 試験紙に対する反応を調べた。その結果はクジャクフモトシダの場合と同じで、すべての株がM型株のパターンを示し、Feigl-Anger 試験紙には陽性であった。これはフモトカグマもフモトシダとイシカグマの交雑種であることを示唆しており、フモトカグマの場合は、さらに染色体の倍数化によりクジャクフモトシダと区別されるものになったことが推測される。

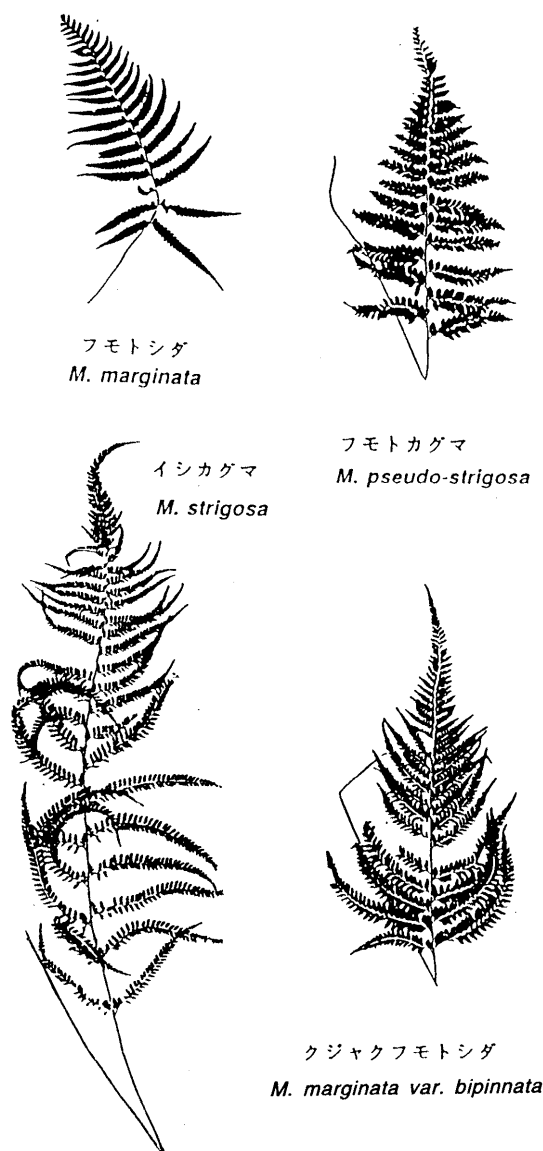


Fig. 5 Silhouette of the Fronds of *Microlepia* Species.

実験の部

成分変異株の識別 乾燥したフモトシダの羽片2～3枚を細粉し、マイクロ試験管に入れ、メタノール1mlを加え、55℃で3時間加熱して抽出する。これをシリカゲルの薄層板（メルク社製、TLC plate, silicagel 60 F254）に3～5回スポットし、クロロホルム：メタノール（5：1）で7cm展開する。UVランプにてfumotonaringinの吸収斑の有無を確認した後、10%硫酸を噴霧し、ホットプレートにて加熱し、発色を観察する。各変異株の指標化合物のおおよそのRf値と発色はつぎのとおり。M型株：microlepin 0.49, 鮮やかな紫色、

4-epimicrolepin, 0.42, 鮮やかな紫色。F型株：fumotonaringin 0.11, 黄色。Y型株：marginatoside A 0.34, 黒褐色, marginatoside B, 0.58, 黒褐色。P型株：fumotoshidin arabinoside, 0.54, 褐色, fumotoshidin A, 0.69, 赤褐色。判定が困難な場合はスポットの回数を増やして行うが、いずれの化合物も含量が多く、判定は容易である。

染色体数の計測 成長している根端を採取し、0.002モルの8-ヒドロキシキノリン水溶液に3～4時間浸す。次に、根端を45%酢酸で15分間固定し、60℃の1規定塩酸と45%酢酸の混合液（3:1）中で1分間解離した後、酢酸オルセイン染色による押しつぶし法でプレパラートを作成した。

Feigl-Anger 試験紙の調製 4,4'-テトラメチルジアミノジフェニルメタン500mg、エチルアセト酢酸銅(II) 500mgをクロロホルム100mlに溶解させた溶液にろ紙を浸す。これを風乾し、冷暗所に保存する。

青酸配糖体の検出 被検植物の乾燥葉から羽片2～3枚を採り、細粉し、小試験管に入れる。これにpH5のクエン酸緩衝液を1～2滴加え、Feigl-Anger 試験紙を近接させて置き、小試験管を密閉する。2時間以内にFeigl-Anger 試験紙が青～青紫に呈色したものを陽性とする。

参考文献

- 1) Part 96 : H. Wada, H. Kasuga, S. Takahashi, T. Hoshino, H. Ueda, N. Tanaka, R. C. Cambie, J. E. Braggins, *Natural Medicines*, **51**, 555 (1997).
- 2) 田中信壽、小林加寿夫、小旗知恵、黒川 弓、和田浩志、遠藤次郎、中村輝子、田中信壽、村上孝夫、斎木保久、薬誌、**113**、70～78 (1993)。
- 3) 和田浩志、大道寺香澄、淵野裕之、遠藤次郎、中村輝子、田中信壽、村上孝夫、斎木保久、薬誌、**114**、27～32 (1994)。
- 4) T. Kuraishi, K. Ninomiya, T. Murakami, N. Tanaka, Y. Saiki, C.-M. Chen, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4883～4892 (1984).

5) N. Nakato, S. Serizawa, *J. Jap. Botany*, **56**, 161~168 (1981).

6) H. Wada, K. Daidohji, N. Tanaka, *Natural Medicines*, **51**, 69~70 (1997).

7) M. A. Brinker, S. D. Seigler, *Phytochemical Bulletin*, **21**, 24~31 (1989).