

学 位 論 文 題 名

野生植物の誘導的抗菌物質とその生成に関する研究

学位論文内容の要旨

病原菌に感染した植物が誘導的に生成する二次代謝産物のうち抗菌活性を有するものは、ファイトアレキシンと呼ばれ植物の防御機構の一端を担っていると考えられている。この現象に対する理解を深めることにより、生態系にやさしい作物保護への足掛りが得られないであろうか。

地球上には250,000種の種子植物が存在する。これらのうちストレス代謝産物を生産する植物を見つけ出すことは、植物の潜在的な強さを探る第一歩になるであろう。本研究では、身近な存在である北海道に自生する200種以上の植物について、塩化第二銅水溶液によるストレスを与えることにより生成する抗菌性二次代謝産物のスクリーニングを行った。その結果、*Cladosporium herbarum* に対して16種の植物が、グラム陰性細菌である *Escherichia coli* に対して5種の植物が、グラム陽性細菌である *Staphylococcus aureus* に対して3種の植物が、イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* に対しては2種の植物が、イネ紋枯病菌 *Pellicularia filamentosa* に対しては7種の植物が強い誘導性の抗菌活性を示した。

これらのスクリーニングの結果などを参考にして数種の植物を選択し、それらが実際にどのようなストレス代謝産物を生成するのか天然物化学的手法を用いて研究を行った。先ず、キク科のセイヨウタンポポ (*Taraxacum officinale* Web.) からストレス代謝産物としてレタスニンA (1)を、常在性の化合物としてシナピルアルデヒドおよびコニフェリルアルデヒドを単離同定した。これらの化合物の同植物からの報告は初めてである。レタスニンAは同じキク科でしかも同じタンポポ亜科ラクチュセアエ連 (*Lactuceae*) に属するレタス (*Lactuca sativa*) のファイトアレキシンとして報告されている。この連に属する8種の植物、

レタス、ニガナ (*L. dentana*)、トゲチシャ (*L. scariola*)、セイヨウタンポポ、エゾタンポポ (*T. hondoense*)、ノゲシ (*Sonchus oleraceus*)、オニノゲシ (*S. asper*)、ハマニガナ (*Ixeris repens*) がレタスニンAを生成することが明らかになった。しかし同じ連に属する植物でも、コウゾリナ (*Picris hieracioides*)、コウリントンポポ (*Hieracium aurantiacum*)、ヤナギタンポポ (*H. umbellatum*)、ブタナ (*Hypochoeris radicata*) の4種はレタスニンAを生成しなかった。

ユリ科のバイケイソウ (*Veratrum grandiflorum* L.) からはレスベラトロール、オキシレスベラトロール、およびそれらの3位水酸基にグルコースが結合した化合物レスベラトロール-3-O- β -グルコシド、オキシレスベラトロール-3-O- β -グルコシド (**2**) のスチルベノイド4種を単離同定した。化合物**2**は新規化合物であった。さらにフラボン配糖体としてアピゲニン-7-O-グルコシド、ルテオリン-7-O-グルコシドおよびクリソエリオール-7-O-グルコシドの3種を単離同定した。

セリ科のイワミツバ (*Aegopodium podagraria* L.) からはストレス代謝産物と思われるポリアセチレン化合物、ファルカリンジオールおよび (*Z*)-1,8-dihydroxy-9-heptadecene-4,6-diyn-3-one (**3**) の2種を、常在性の化合物としてスコポレチンを単離同定した。化合物**3**は新規化合物であった。

アヤメ科のキショウブ (*Iris pseudacorus* L.) からは多くのフラボノイドが単離された。新規イソフラボン**4**~**6**はそれぞれイリリンA~Cと命名した。その他イソフラボノイドとしてイリステクトリゲニンB、3'-O-メチルオロボール、イリステクトリゲニンA、プラテンセイン、テクトリゲニン、ジェニステインおよびビオカニンAを単離した。これまで報告例の少ないクマロノクロモン類が単離同定され、新規化合物をアヤメニンA~E (**7**~**11**)と命名した。また、既知クマロノクロモンとして 5,7,3'-trihydroxy-6-methoxycoumaronochromone、ルピナルビンAを単離した。さらに既知フラボノイドとして、アピゲニン、ヒスピデュリン、アルピノン、7-O-メチルジヒドロケンフェロール、5,7,2'-トリヒドロキシフラバノンと単離同定した。

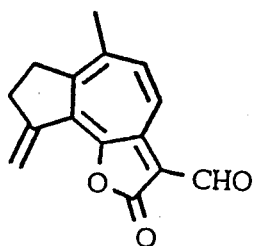
アヤメ科の植物からはB環上では2'位のみが酸化された化合物が多く単離されていることから、この科の植物ではこれまで知られているマメ科におけるイソフラボノイドの生合成と異なり、オルトヒドロキシケイ皮酸を基質としたフラボンの生合成系が予想された。なお、ここ

で得られた化合物はキショウブから初めて報告されたばかりでなく、アヤメ科のストレス代謝産物の研究としても最初の例であった。得られた化合物の抗菌活性はスチルベンで見られたように水酸基のグルコシル化、あるいはイソフラボンで見られたように水酸基のメチル化、またはクマロノクロモンへの環化などによって弱まる傾向が認められた。

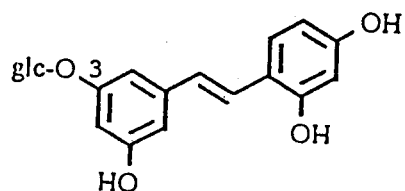
キショウブから得られた化合物の機器分析データの詳細な検討により、クマロノクロモン類の ^{13}C -NMR スペクトルにおける化学シフトを初めて正確に帰属するとともに、(1)フラボノイドにおいては6位のメトキシル化によって5位水酸基の化学シフトは対応する6位無置換体に比べて0.20~0.23 ppm 低磁場シフトすること、(2)質量分析によりクマロノクロモンがイソフラボンとは異なるタイプのレトロ・ディールス・アルダー開裂を示すことを初めて見いだした。

次に植物の培養細胞を用いてファイトアレキシンの生成に影響を与える因子について実験を行った。先ず、セイヨウタンポポが培養細胞の状態でも僅かではあるが生物学的エリシターや塩化第二銅または紫外線のストレスによってレタスニンAを誘導的に生成することが分かった。エリシターや塩化第二銅によるストレスを与えた場合、レタスニンAは1時間後から生成が見られ、2時間後にピークに達しその後減少した。この反応はこれまで報告されているファイトアレキシンの生成に比べてかなり速いものであった。またいくつかの活性酸素の消去剤を加えてレタスニンAの生成量を調べたところ、紫外線ストレスに対してはSODおよびカタラーゼが僅かにレタスニンAの生成を減少させた。また、*t*-butyl hydroperoxide およびアスコルビン酸がレタスニンAの生合成を誘導した。さらに、ダイズ懸濁培養細胞を *Phytophthora megasperma* 由来のエリシターで処理することにより、素早く一時的に見られる活性酸素の発生がルミノールを用いた化学発光法により観察された。この反応はSOD、カタラーゼ、アスコルビン酸、および窒素気流中で阻害された。酵素系を用いてこの反応を模擬的に構築することにより、先ず初めに生成される活性酸素種はスーパーオキシドアニオンであること、この分子が直接的に、あるいは不均化して生成した過酸化水素がパーオキシダーゼ反応の電子受容体になり間接的にルミノールを酸化して化学発光を引き起こしていることが示唆された。このことからルミノールを用いた化学発光の検出系にはパー

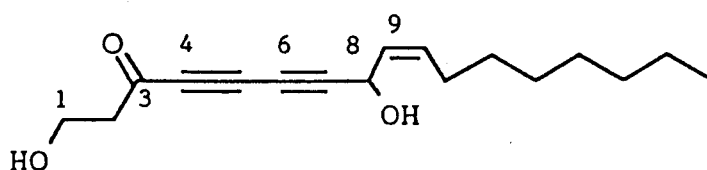
オキシダーゼなどの影響が大きく現われることが予測された。



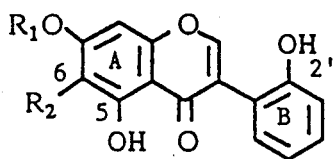
lettucenin A (1)



oxyresveratrol-3-O-β-glucoside (2)



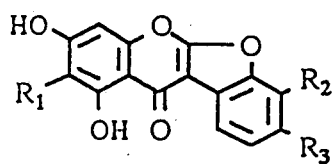
(Z)-1,8-dihydroxy-9-heptadecene-4,6-diyn-3-one (3)



irilin A (4): $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OMe}$

irilin B (5): $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OMe}$

irilin C (6): $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$



ayamenin A (7): $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$

ayamenin B (8): $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$

ayamenin C (9): $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

ayamenin D (10): $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$

ayamenin E (11): $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OMe}$

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 谷 純 也
副 査 教 授 市 原 耿 民
副 査 助 教 授 田 坂 哲 士
副 査 名 誉 教 授 匂 坂 勝 之 助

学 位 論 文 題 名

野生植物の誘導的抗菌物質とその生成に関する研究

本論文は和文で記され、図188、表48、引用文献122を含み、総頁数375からなり、内容は5章に分けられ、さらに英文概要が付してある。ほかに7編の参考論文が提出されている。

病原菌が感染した植物細胞で誘導的に作り出される抗菌物質はファイトアレキシンと呼ばれ、植物の防御機構の一端を担っている。著者は野生植物に注目して誘導的抗菌物質を単離同定し、化学的側面から植物のもつ潜在的な強さを解明しようとして本研究に着手した。先ず、感染の代わりに塩化第二銅水溶液によるストレスを与え、生成する抗菌性二次代謝産物をTLCバイオオートグラフィーで検出するという簡便な方法を確認して多数の野生植物をスクリーニングにかけた。

第1章は緒論、第2章では北海道の野生植物200種以上をスクリーニングにかけた結果、供試菌*Cladosporium herbarum*に対して16種の植物が強い誘導的抗菌活性を示した。その他のカビ、酵母、細菌数種を用いた別のバイオアッセイによるスクリーニングも行った。

第3章では数種の植物を選び、どのようなストレス代謝産物を生成するのか天然物化学的手法を用いて調べた。セイヨウタンポポ (*Taraxacum officinale* Web., キク科) からレタスニンA (1) を単離同定した。セイヨウタンポポはレタスと同じタンポポ亜科、ラクチュセアエ連に属するが、この連の7属12種についてレタスニンA生成の有無で分けたところ生成するものが8種、生成しないものが4種であった。

バイケイソウ (*Veratrum grandiflorum* L., ユリ科) からはスチルベノイド4種を単離同定、うちオキシレスベラトロール-3-O- β -グルコシド (2) は新規化合物であった。さらにフラボン配糖体3種を単離同定し

た。イワミツバ (*Aegopodium podagraria* L., セリ科) からはストレス代謝産物と思われるポリアセチレン化合物2種〔うち(Z)-1,8-dihydroxy-9-heptadecene-4,6-diyn-3-one (3) は新規〕を単離同定した。

キショウブ (*Iris pseudacorus* L., アヤメ科) からは多種類のフラボノイドが単離同定された。そのうちイリリンA(4)、B(5)、およびC(6)と名づけたイソフラボン、ならびにアヤメニンA(7)、B(8)、C(9)、D(10)、およびE(11)と名づけたクマロノクロモン類は新規化合物であった。アヤメ科植物からはB環上では2'位のみが水酸化された化合物が多く単離されており、マメ科に見られるイソフラボン類と異なる点で生合成的にも興味深い。そのほか多数の既知のフラボノイドを単離同定したが、これらの化合物はキショウブからは初めての報告であるばかりでなく、アヤメ科のストレス代謝産物の研究としても最初の例であった。

得られたストレス化合物の抗菌活性は、スチルベノイドでは水酸基のグルコシル化、イソフラボンでは水酸基のメチル化、あるいはクマロノクロモンへの環化などによって弱まる傾向のあることが分かった。このことは植物細胞における抗菌物質の解毒を示唆する。

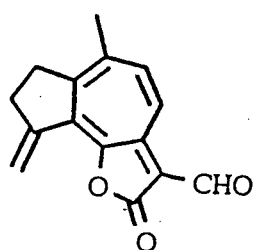
キショウブから得られた化合物の機器分析データの詳細な検討により、クマロノクロモン類の¹³C-NMRにおける化学シフトをはじめて正確に帰属するとともに、(1)フラボノイドの6位のメトキシル化によって5位水酸基の化学シフトは、対応する6位無置換体に比べて0.20~0.23 ppm低磁場シフトすること、(2)クマロノクロモンの質量分析において、これまで報告のないイソフラボンとは異なるタイプのレトロ・ディールス・アルダー開裂を起こすことを見いだした。これらの法則性は類似化合物の構造解析に役立つ。

第4章ではストレス代謝産物の生成に影響を与える因子として、とくに活性酸素に注目して検討を加えた。セイヨウタンポポ培養細胞に生物のエリシターや塩化第二銅、または紫外線ストレスでわずかではあるがレタスニンAが生成することを認めた。活性酸素あるいは酸化的ラジカルが抗菌物質レタスニンAの誘導に関わっていることを示唆する結果が得られた。さらにダイズ懸濁培養細胞を用い、エリシター処理による活性酸素の発生をルミノールを用いた化学発光法により検出し、酵素系を用いてこの反応を模擬的に構築することにより、初めに生成される活性酸素種はスーパーオキシドアニオンであることを

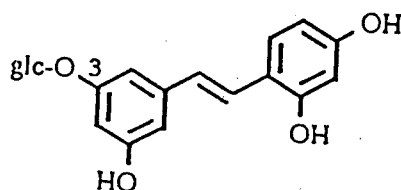
支持する成果を得た。

第5章は総括である。以上のように本研究は数種の野生植物を対象として防御機構のひとつと考えられる誘導的抗菌物質について主として化学的アプローチを試み、多くの新知見を得、さらに抗菌物質の誘導に関わる因子についても考察を加えたもので天然物化学、植物生化学の発展に寄与するところが大きい。

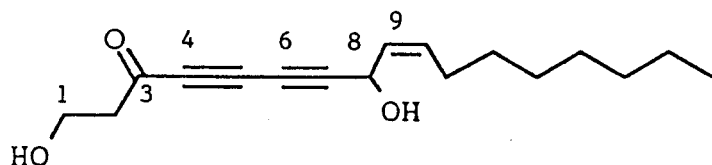
よって審査員一同は、別に行った学力確認試問の結果と合わせて、本論文の提出者 埴 藤徳 は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。



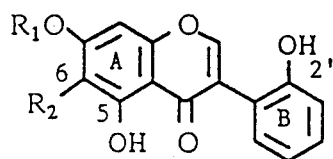
lettucenin A (1)



oxyresveratrol-3-O-β-glucoside (2)



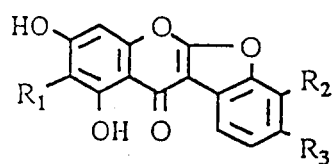
(Z)-1,8-dihydroxy-9-heptadecene-4,6-diyn-3-one (3)



irilin A (4): $R_1=\text{Me}$, $R_2=\text{OMe}$

irilin B (5): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OMe}$

irilin C (6): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{H}$



ayamenin A (7): $R_1=\text{OMe}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{H}$

ayamenin B (8): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{H}$

ayamenin C (9): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$

ayamenin D (10): $R_1=\text{OMe}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{OH}$

ayamenin E (11): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{OMe}$