

学位論文題名

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM *PSEUDOMONAS CEPACIA* D-202 AGAINST THE STORAGE ROT OF SUGER BEET AND FROM A TREE DISEASE PATHOGEN *VALSA AMBIENS*

（テンサイ貯蔵腐敗病の拮抗微生物 *Pseudomonas cepacia* D-202
及び樹木病原菌 *Valsa ambiens* の産生する生理活性物質）

学位論文内容の要旨

第一部 テンサイ貯蔵腐敗病の拮抗微生物 *Pseudomonas cepacia* D-202
の抗菌物質。

近年、植物の病害防除の手段として拮抗微生物の利用が注目され、多くの病害について活発に研究が行なわれてきている。そのうち、テンサイ貯蔵中の腐敗菌 *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* に対し拮抗微生物 *P. cepacia* D-202が有効であることが明らかとなった。本研究ではこの現象の化学的解明のため、本菌から抗菌物質を単離し、その構造を決定することを行った。

B. cinerea に対する抗菌活性試験を指標として *P. cepacia* D-202の乾燥菌体の CHCl_3 : MeOH (2:1)抽出物を分画し、phospholipids 1-9 及び cepaciamide A (10) と cepaciamide B (11) を得た。3-11は新規化合物である。

5, 6, 7は混合物として得られ、ホスホリパーゼ A_2 で加水分解して二種の脂肪酸 5b (=6b), 7b が得られた。ヒドロキシ脂肪酸 5b は NMR で一個の二重結合を有することが明らかになったのでオゾン酸化した。生成物を GCMS 分析したところ、undecanoic acid が検出され、二重結合の位置は 5, 6 位と決定した。Simmons-Smith 反応により二重結合をシクロプロパン化し NMR 測定により二重結合を *cis* と決定した。水酸基の位置は NMR で 3 位のプロトン照射することにより、2 位と決定した。その絶対配置は改良 Mosher 法により *R* と決定した。このことより 5b は (2*R*, 5*Z*)-2-hydroxy-5-hexadecenoic acid と決定した。ヒドロキシシクロプロパン脂肪酸 7b は、 PtO_2/H_2 還元後 CrO_3 酸化し、GCMS 分析法により、シクロプロパンの位置を 5, 6 位と決定した。水酸基の位置と立体化学は 5b と同様の方法により 2(*R*) と決定した。

リパーゼ加水分解後のphosphoethanolamine残基部分はさらにアルカリ分解すると三種の脂肪酸、hexadecanoic acid (5a)、cis-5, 6-methylene hexadecanoic acid (6a) とシクロプロパン脂肪酸(7a)が得られた。6aのシクロプロパン位置は、7bと同様の環開裂反応により5, 6位と決定した。その立体配置は環メチレンシグナルのNMR測定結果からcisと決定した。その絶対配置は以下に述べる合成により決定した。D-Mannitolを出発原料に既知反応でoxabicycleを合成し、その後Wittig反応を主とした12段階の反応により、(5S, 6R)-5, 6-methylenooctadecanoic acidの合成に成功した。これと6aとの比旋光度が一致したことにより、6aの絶対配置は5(S), 6(R)と決定した。次に7bの還元物脱水酸基を行ない、その還元物を6aの還元物と比較することにより、7bのシクロプロパン位置の立体化学を6aと同じ5(S), 6(R)と決定した。5, 6, 7の混合物のMS測定による分子量734(5), 746(6), 760(7)の結果から、5, 6, 7の構造を決定した。化合物1, 2及び新規化合物3と4の混合物、8と9の混合物の構造を同様の方法に明らかにした。

非リン脂質化合物(10, 11)では、共にオルニチンを構成成分として有することがNMRによる測定で明らかになった。10は、 $M^+ m/z$ 663で、IR測定によりエステル(1724cm^{-1})とアミド(1620cm^{-1})結合を有し、 ^{13}C -NMR測定172, 173, 175 ppmから三つのカルボニルの存在が明らかになった。アルカリ加水分解により、ヒドロキシシクロプロパン脂肪酸(10a)が得られ、7bとスペクトルデータ及び旋光度が一致した。オルニチン残基は $M^+ m/z$ 368 ($\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$)を示し、環化したオルニチンと3-hydroxyhexadecanoic acidとから成ることが明らかになった。環化したオルニチンの立体化学は、L-オルニチンのアシル化物を調製し、CDを測定することにより、R(D型)と決定した。3-hydroxyhexadecanoic acidの立体化学は改良Mosher法により、Rと決定した。

11は10との混合物として得られた。NMRから二重結合の存在とMSで新しく $M^+ m/z$ 649のピークを示した以外他のスペクトルデータはほとんど10と同じであった。混合物の加水分解により、10a、オルニチン残基と共に脂肪酸11aが得られた。11aのメチルエステルは $M^+ m/z$ 312 ($\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3$)を示し、ヒドロキシ不飽和脂肪酸であることが明らかになった。オゾン酸化法により、二重結合の位置を5, 6位、Simmons-Smith法によるシクロプロパン生成物のNMR測定により二重結合をcisと決定した。NMRにより2-位の水酸基の存在が明らかになり、立体化学は改良Mosher法によりRと決定した。以上の結果、10, 11の立体化学を含めた構造が明

らかになり、10 を cepaciamide A、11 を cepaciamide B と命名した。

B. cinerea に対する 100 ppm での抗菌活性は、1, 2 は共に示さなかったが、混合物 3, 4 は 32%、混合物 5, 6, 7 は 46%、混合物 8, 9 は 41%、混合物 10, 11 は 51% であった。10, 11 の加水分解によって得られるオルニチン残基は 84% で最も高い活性を示した。テンサイ貯蔵中の腐敗菌抑制に、これらの化合物が関与している可能性を示した。

第二部、樹木病原菌 *Valsa ambiens* の産生する生理活性物質

本研究では、サクラ類胴枯病原菌である *Valsa ambiens* の産生する植物毒素の単離及び構造決定を目的とする。

Valsa ambiens の代謝産物について、レタス実生に対する生育阻害活性試験を指標として生理活性物質の検索を行い、活性物質として化合物 12-17 を単離した。

二種のフェノール化合物(12, 13)の構造は、種々のスペクトル分析により新規化合物 2, 4-dihydroxy-3, 6-dimethylbenzaldehyde (12) と Scytalone (13) と決定した。ヒドロキシ不飽和脂肪酸 14 は $C_{14}H_{20}O_2$ (M^+ 220) で三個の二重結合を有し NMR と 1H - 1H COSY により、平面構造を (2*E*, 4*E*, 8*E*)-13-hydroxy-2, 4, 8-tetradecatrienoic acid と決定した。立体化学は改良 Mosher 法で *S* と決定した。(S)-Methyl-3-hydroxybutyrate を出発原料に Wittig 反応、光反応を含む 14 段階を経る、光学活性体の合成を行ない、絶対配置を含めた構造の確認を行なった。さらに 8-*Z* 体の合成も行ない、NMR 分析では解読不十分であった、14 の 8 位が *E* 体であることを確認した。14 のグリセロールエステルである 15a, 15b はジャステレオマー混合物として得られたが、MTPA エステルに誘導することにより分離出来た。その NMR 測定により 2' 位の立体化学を 15a は *S*、15b は *R* と決定した。同様にして、16 及び 17 の構造を決定した。

レタス幼根と胚軸に対する成長阻害活性は、1mM 濃度で 14-17 は幼根に対し 40-52%、胚軸に対し 44-60% であった。また、構造活性相関を調べたところ、8*E*, 8*Z* の立体化学による差がなく、炭素数にも相関はみられず同程度の活性を示した。

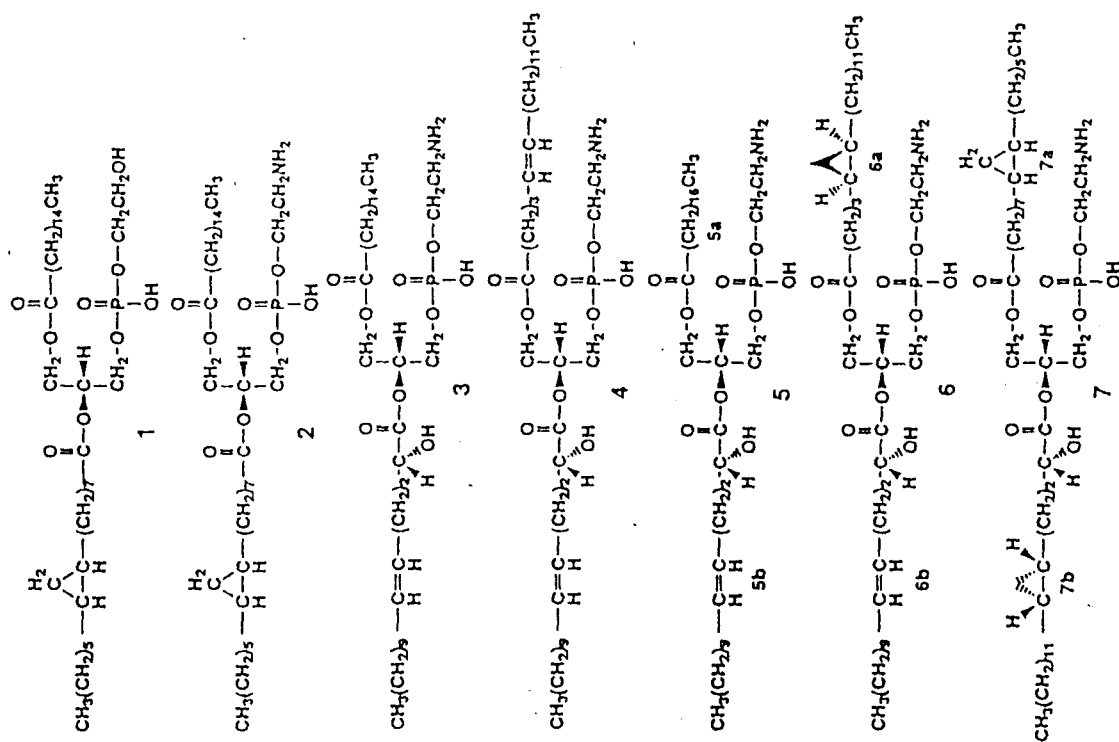


Fig.1: Compounds 1-7 Isolated from *P. cepacia* D-202.

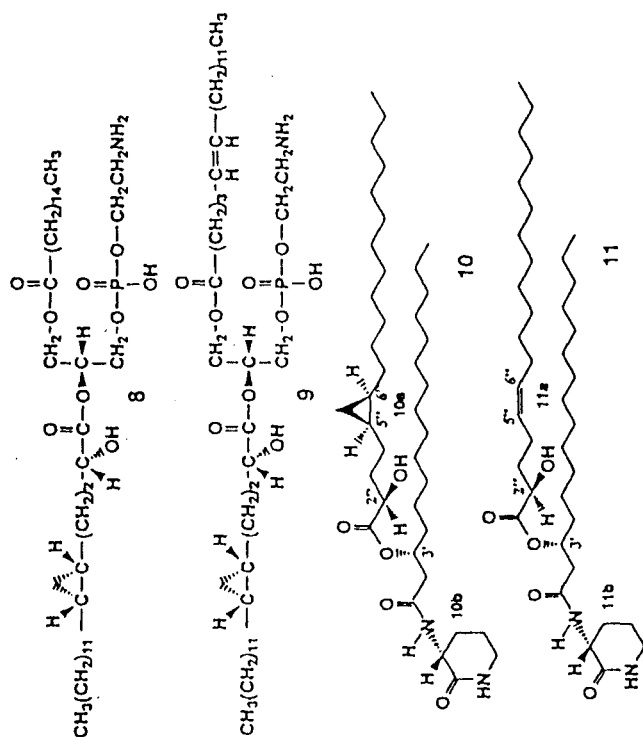


Fig. 2: Compounds 8-11 isolated from *P. cepacia* D-202.

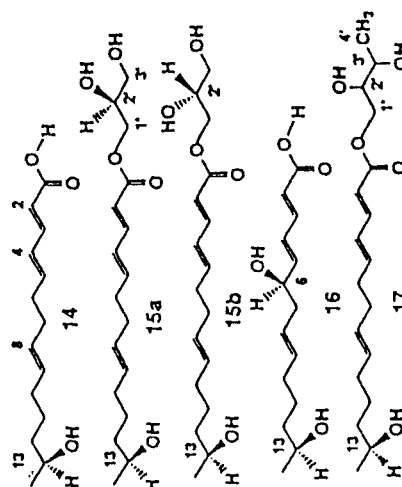


Fig. 3: Compounds 14-17 Isolated from *Valsa ambiens*.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 原 耿 民

副 査 教 授 水 谷 純 也

副 査 助 教 授 吉 原 照 彦

学 位 論 文 題 名

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM *PSEUDOMONAS CEPACIA* D-202 AGAINST THE STORAGE ROT OF SUGER BEET AND FROM A TREE DISEASE PATHOGEN *VALSA AMBIENS*

(テンサイ貯蔵腐敗病の拮抗微生物 *Pseudomonas cepacia* D-202
及び樹木病原菌 *Valsa ambiens* の産生する生理活性物質)

本論文は緒論、本文2部で構成され、図58、表11、スキーム9、引用文献63を含む、総頁数194頁の英文論文である。ほかに参考論文7編が添えられている。

植物病原菌の産生する生理活性物質は植物病害における病徴発現に関わる重要因子である植物毒素としての役割が解明されているほか、抗菌性物質や植物ホルモンのみられるような農薬や植物成長調節物質の給源としての可能性も大きいことから、多面的な応用研究が展開されている。本論文は拮抗微生物からの新規抗菌物質と樹木病原菌からの新規植物毒素の単離・構造研究と生理活性について述べられている。

第1部では植物の病害防除の手法として拮抗微生物の利用が注目されてきているが、テンサイ貯蔵中の腐敗病菌 *B. cinerea*, *P. expansum* に対し拮抗微生物 *P. cepacia* の乾燥菌体抽出物が抗菌活性を示すことが明らかにされていたので、この抽出物を分画し、リン脂質1～9及び cepaclamide A(10)と cepaclamide B(11)を得て、構造、抗菌活性につき述べたものである。

化合物1、2は既知化合物であることを確認した。化合物3、4は混合物として得られたが、そのままホスホリパーゼならびに塩基による加水分解を行い、生成物の構造を分光学的にそれぞれ確定することにより、3、4の全構造を決定した。

化合物5、6、7も混合物として得られたが、同じ酵素で加水分解して得られる二種の脂肪酸5b(=6b)、7bをNMRによる構造解析、オゾン酸化物のGCMS分析、合成化学的手法を併用し決定した。5bの2位の水酸基の絶対配置は改良Mosher法によりRと決定した。ヒドロキシシクロプロパン脂肪酸7bはシクロプロパン環の還元的開裂反応、酸化、GCMS分析によりその位置を5、6位と決定した。

7bの水酸基の位置と立体化学は5bと同様の方法により2(R)と決定した。リパーゼ加水分解後のホスホエタノールアミン残基はさらに塩基で処理することにより3種の脂肪酸5a、6a、7aを得ている。5aはhexadecanoic acidである。6aのシクロプロパン環位置は7bと同様の環開裂反応により5、6位と決定した。この

絶対配置はD-マンニトールを出発原料として (5S, 6R)-5,6-methylenoctadecanolic acid を合成し、これと6aの構造、比旋光度が一致したことより、6aの絶対配置は5(S)、6(R)と決定した。7aは既知化合物である。以上の結果と5、6、7の混合物のマススペクトルの結果と考えあわせ、これらの構造を決定した。混合物8、9の構造も同様の方法により決定している。

非リン脂質化合物10、11は抗菌活性の最も高い画分から得られ、共にオルニチンを構成成分とすることがNMRの測定より明らかとなった。Cepaciamide A (10)はマススペクトルで分子量を決定し、赤外線吸収スペクトルでエステル基、アミド基の存在を、¹³C-NMRで3個のカルボニル基の存在を確認した。アルカリ加水分解ではヒドロキシシクロプロパン脂肪酸が得られ、これと7bが旋光度を含め一致することからこの構造を確認した。オルニチン残基は分子式C₂₁H₄₀O₃N₂より環化したオルニチンと3-hydroxy-decanoic acidからなること、L-オルニチンのアシル化物の円二色性スペクトルよりオルニチンはD型、水酸基は改良Mosher法によりRと決定した。11は10との混合物として得られたが、スペクトルデータ及び加水分解反応などよりcepaciamide B (11)の構造を決定した。

B. cinerea に対する100ppmでの抗菌活性は1、2共に認められなかったが、混合物3、4は32%、混合物5、6、7は46%、混合物8、9は41%、混合物10、11は51%であった。しかし10、11の加水分解によって得られるオルニチン残基は84%と最も高い抗菌活性を示したことから、テンサイ貯蔵中の腐敗抑制に、これらの化合物が関与している可能性を示した。

第二部のサクラ類胴枯病菌 *Valsa ambiens* の産生する植物毒素についてはレタス実生に対する生育阻害試験により12～17の活性物質を得ている。スペクトル分析を主とする構造解析により、12は2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzaldehyde, 13はscytaloneと決定した。ヒドロキシ脂肪酸14はNMRより (2E, 4E, 8E)-13-hydroxy-2,4,8-tetradecatrienoic acid と推定した。立体化学を含めた構造を確定するため、(S)-methyl-3-hydroxy-butyrate を出発原料に14段階を経て14の合成を行った。この合成によりNMRでは解析が困難であった8位の立体化学がE体であることを確認した。さらにグリセロールエステル15a、15bをMTPAエステルとして立体化学を決定したほか、同様の手法で16、17の構造も決定した。

レタス幼根と胚軸に対する成長阻害活性試験の結果、14～17の化合物はそれぞれ40～52%、44～60%の阻害活性を示した。

以上のように本研究は植物病理化学に新しい知見を加えたのみならず、農産物の貯蔵、保蔵技術にも新たな道を開くものであり、基礎から応用に至る学術的貢献が極めて大きい。よって審査員一同は最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 焦 瑩は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格のあるものと認定した。

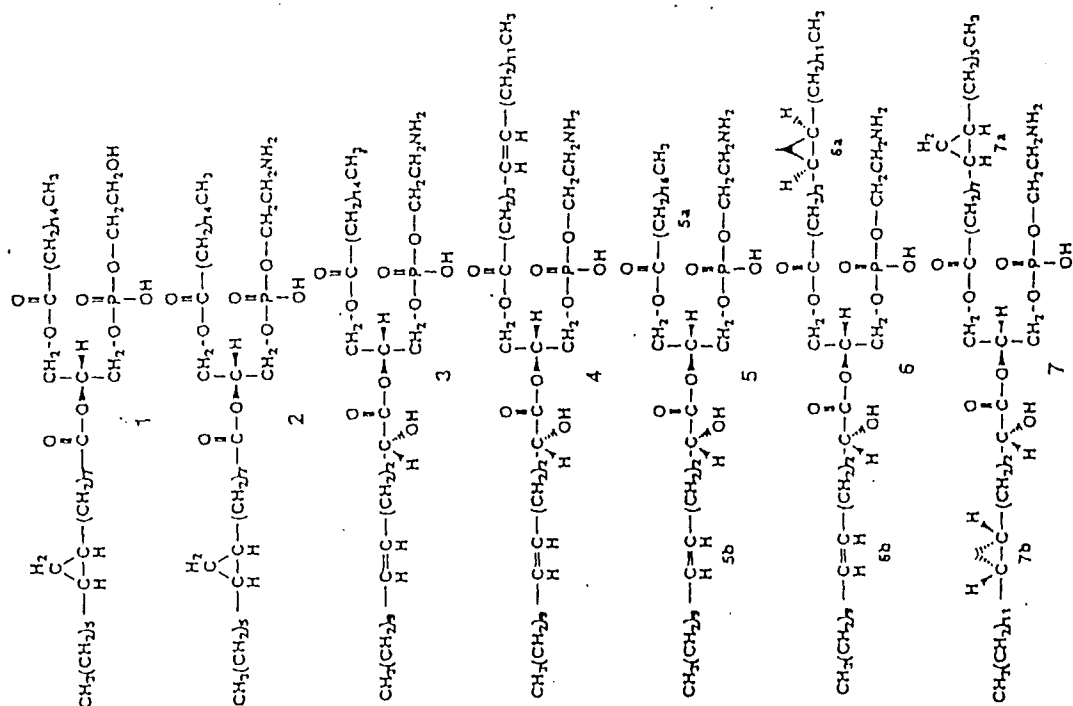


Fig. 1: Compounds 1-7 isolated from *P. cepacia* D-202.

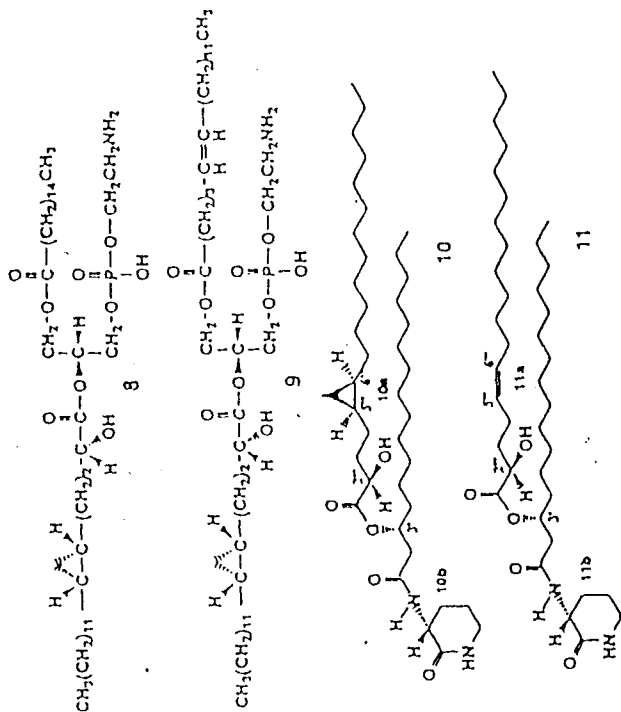


Fig. 2: Compounds 8-11 isolated from *P. cepacia* D-202.

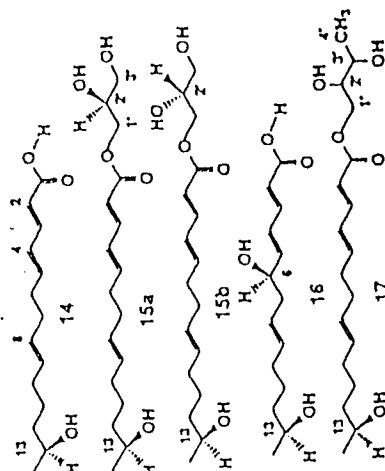


Fig. 3: Compounds 14-17 isolated from *Valsa ambiens*.