

学位論文題名

Studies on Biologically Active Constituents
from *Ginkgo biloba*

(イチヨウに含まれる生物活性を有する化学成分に関する研究)

学位論文内容の要旨

本研究は、イチヨウ (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) 偽果から *Aphanomyces cochlioides* 二次遊走子を用いた検定により生理活性化合物を検索したものである。イチヨウは古くから数々の病気治療に用いられており、多様な生物活性を示す化合物群がこの植物から単離されている。しかしながら、イチヨウに含まれる成分の卵菌類二次遊走子に対する生物活性については全く報告がなかった。

本研究論文は、1) anacardic acid 類、cardol および cardanol の単離と、anacardic acid のメチル化、加水分解、還元等を中心にした各種化学誘導、2) 活性化合物の *A. cochlioides* に対する生理活性 (遊走子遊泳停止活性、遊走子細胞溶解誘導活性、菌糸伸長阻害活性および遊走子生成抑制活性) の定量的評価、3) 各種 anacardic acid 誘導体の抗細菌活性検定、4) anacardic acid 処理で誘導される細胞傷害過程の走査型電子顕微鏡による観察、および 5) 上記の生理活性に関する構造活性相関の検証、の 5 項目の研究から成り立っている。

1) anacardic acid 類、cardol および cardanol の単離と、anacardic acid のメチル化、加水分解、還元等を中心にした各種化学誘導

イチヨウ未熟果実の酢酸エチル可溶部から、*A. cochlioides* 遊走子に対する遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を指標に、5 種類の化合物を単離し、各種分光分析によってそれらを同定した。すなわち、これら単離化合物はそれぞれ 22:1 ω^7 -anacardic acid (1), 24:1 ω^9 -anacardic acid (2), 22:0-anacardic acid (3), 21:1 ω^7 -cardol (4), および 21:1 ω^7 -cardanol (5) であった。anacardic acid 混合物 (1m) は、メチルエステル誘導体、2-O-メチルエーテル誘導体、ベンジルアルコールへの還元体、および 2-O-アセチル化物に変換した。また、22:1 ω^7 -2-O-methylanacardic acid (1-c) を純粋な化合物 1 から誘導した。

2) 活性化合物の *A. cochlioides* に対する生理活性 (遊泳停止活性、細胞溶解誘導活性、菌糸伸長阻害活性および遊走子生成抑制活性) の定量的評価

二次遊走子に対する遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性は、その定量的評価法が確立されておらず、またそれらの活性そのものが化合物投与量に相関を示すものかどうかとも分かっていなかった。本研究においては、まずこれらの定量的活性評価法の条件検討をおこない、遊走子密度、化合物投与量、経時変化量についてそれぞれ予備的な検討を実施した。被検化合物に対する応答が経時的に進行し続けるため、デジタルカメラを用いた記録映像をコンピューターのモニター画面上で計測し、複数の化合物の活性を同時に比較した。この際、ボルトテックス処理によって物理的に被のう胞子化させたものを計測し、本アッセイ系におけるバックグランドとした。溶解を示した遊走子は光学顕微鏡下での観察が困難なため、系内に残留した被のう胞子の数を数え、それをバックグランドの値から差し引いて、溶解頻度を%で表示した。化合物の投与量によって認められる生理的变化 (dose response) の相関を求め、1 の場合は 10⁻⁶ でほぼ直線的な相関線を示すことが分かった。また、一定濃度の 1 における反応処理後の経過時間と遊走子遊泳停止活性および遊走子細胞溶解誘導活性との関係は、前者が 20-40 分、後者が 1 時間から 3 時間の間で、明らか

な直線性を示した。これらの条件を組み合わせ、遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を定量的に評価する方法を確立した。

化合物 1, 2, 3, 4 および 1-c はそれぞれ、*A. cochlioides* 二次遊走子に対する遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を示した。モル濃度当たり最も高い活性を示したのは化合物 1-c であった。両活性は、1-c > 1 > 4 > 2 > 3 の順に低下した。また、比率を変えたこれら化合物の混合物について、細胞溶解誘導活性の相対的強度を調べた。興味あることに、化合物 1 あるいは 4 単独に比べ、4 と 1 の混合物では明らかな活性の上昇が認められ、それぞれの作用機構が異なることが示唆された。菌糸伸長阻害活性および遊走子生成抑制活性については、合成農薬である fluazinam (6) を指標化合物として、化合物 1 の定量的活性評価を実施した。

3) 各種 anacardic acid 誘導体の抗細菌活性検定

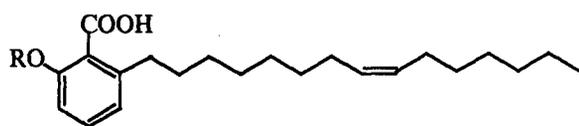
ブイヨン寒天平板上でのペーパーディスク法で検定したところ、化合物 1 および 1-c はそれぞれ 3.12 µg/disc および 1.56 µg/disc で *Bacillus subtilis* に対する抗細菌活性を示した。化合物 4 はやや弱いながらも活性を示したが、5 を含め、その他の誘導体は 200 µg/disc で全く活性を示さなかった。これに対し、化合物 1 および 1-c を含めた全ての被検化合物が、グラム陰性細菌である *Escherichia coli*、植物病原性糸状菌である *Pythium vexans*、腐生性不完全菌である *Cladosporium herbarum* に対し、何ら生育阻害活性を示さなかった。

4) anacardic acid 処理で誘導される細胞傷害過程の走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡により、遊走子の溶解までの過程を追跡した結果、以下のことが分かった。anacardic acid 類に曝露された遊走子は、初期反応として鞭毛の崩壊がまず引き起こされ、被のう胞子への形態変化を経ずに、細胞表層の特定部位の崩壊が認められる。その後、細胞内容物が放出されて細胞の完全な溶解に至る。これらの観察から、anacardic acid 類の作用部位は鞭毛および細胞膜にあり、細胞表層の崩壊は鞭毛基部付近から開始する可能性が示唆された。

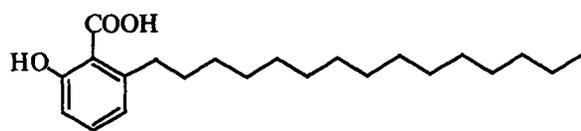
5) 上記の生理活性に関する構造活性相関の検証

以上の結果から、anacardic acid 類の *A. cochlioides* 二次遊走子に対する遊泳停止活性と引き続いて認められる細胞溶解誘導活性は、特異的であり、かつ、*B. subtilis* に対する抗細菌活性との強い相関があることが明らかになった。遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を発現するためには、遊離のカルボキシル基 (-COOH) および適当な長さをもち少なくとも 1 箇所の炭素炭素間二重結合が存在するアルキル側鎖が必要であると考えられた。芳香環上にある分子内水素結合性のフェノール水酸基は、これらの活性には必ずしも重要ではなく、むしろメチル化によって完全にキャップされた化合物 1-c の方が活性が増大した。カルボキシル基を持たず芳香環上の 2 カ所にフェノール水酸基を保持している cardol (4) は、1 にはやや劣るものの有意な活性を示したが、化合物 1 の脱炭酸生成物に相当する cardanol (5) は全く活性を示さなかった。先に示したように、化合物 1 あるいは 4 単独に比べ、4 と 1 の混合物では明らかな活性の上昇が認められることから、化合物 4 の 4-位の水酸基の持つ役割を調べることで、1 と 1-c の作用機構間の差違が明らかになるかも知れない。構造と活性の相関については、まだ例証による検討が不十分である。例えば、二重結合の位置や個数の違い、あるいはそれらの幾何異性体間で活性発現に大きな違いがあるかどうかなど、分からないことが山積している。しかしながら本研究は、卵菌遊走子の感染に起因する多くの土壌伝播性の病気の生物合理的防除に新たな方向性を示す結果を包含しているものである。

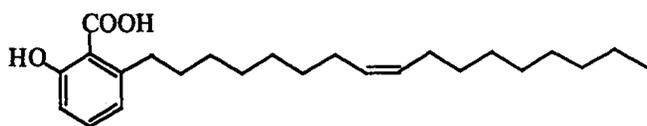


1 : R=H, 22:1- ω^7 -anacardic acid

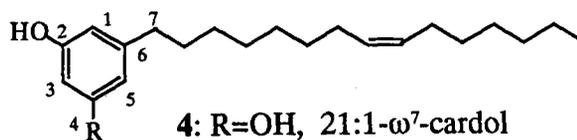
1-c: R=CH₃, 22:1- ω^7 -2-*O*-methylanacardic acid



3: 22:0-anacardic acid



2: 24:1- ω^7 -anacardic acid



4: R=OH, 21:1- ω^7 -cardol

5: R=H, 21:1- ω^7 -cardanol

学位論文審査の要旨

主査 教授 田原 哲 士
副査 教授 吉原 照 彦
副査 助教授 橋 床 泰 之
副査 講師 福 士 幸 治

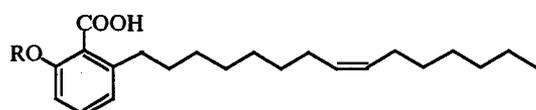
学位論文題名

Studies on Biologically Active Constituents from *Ginkgo biloba*

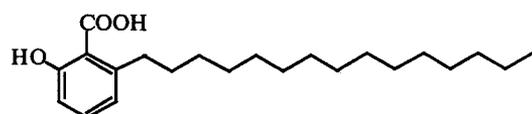
(イチヨウに含まれる生物活性を有する化学成分に関する研究)

本論文は、英文 122 頁、図 32、表 35、6 章からなり、ほかに図 37 からなる付録と参考論文 1 編が付されている。

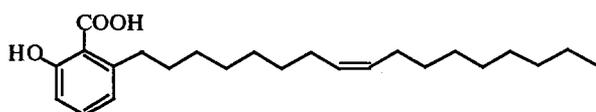
本研究は、イチヨウ (*Ginkgo biloba*, Ginkgoaceae) 偽果から *Aphanomyces cochlioides* 二次遊走子を用いた検定により生理活性化合物を検索したものであり、1) anacardic acid 類、cardol および cardanol の単離と、anacardic acid のメチル化、加水分解、還元等を中心にした各種化学誘導、2) 活性化合物の *A. cochlioides* に対する生理活性 (遊走子遊泳停止活性、遊走子細胞溶解誘導活性、菌糸伸長阻害活性および遊走子生成抑制活性) の定量的評価、3) 各種 anacardic acid 誘導体の抗細菌活性検定、4) anacardic acid 処理で誘導される細胞傷害過程の走査型電子顕微鏡による観察、および 5) 上記の生理活性に関する構造活性相関の検証を実施し、以下の結果を得ている。



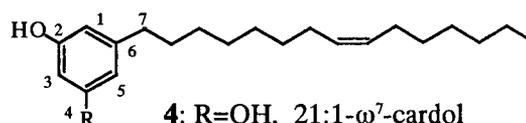
1: R=H, 22:1- ω^7 -anacardic acid
1-c: R=CH₃, 22:1- ω^7 -2-*O*-methylanacardic acid



3: 22:0-anacardic acid



2: 24:1- ω^7 -anacardic acid



4: R=OH, 21:1- ω^7 -cardol
5: R=H, 21:1- ω^7 -cardanol

1) 先ず、イチヨウ未熟果実の酢酸エチル可溶部から、*A. cochlioides* 遊走子に対する遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を指標に、5種類の化合物を単離し、各種分光分析によってそれらをそれぞれ 22:1 ω^7 -anacardic acid (1), 24:1 ω^9 -anacardic acid (2), 22:0-anacardic acid (3), 21:1 ω^7 -cardol (4), および 21:1 ω^7 -cardanol (5) と同定した。anacardic acid 混合物 (1m) は、メチルエステル誘導体、2-O-メチルエーテル誘導体、ベンジルアルコールへの還元体に変換し、また、22:1 ω^7 -2-O-methylanacardic acid (1-c) を純粋な化合物 1 から誘導した。

2) *A. cochlioides* に対する生理活性 (遊泳停止活性、細胞溶解誘導活性および菌糸伸長阻害活性) の定量的活性評価法の条件検討をおこない、デジタルカメラを用いた記録映像をパソコンのモニター画面上で計測し、また、ボルテックス処理によって物理的に被のう胞子化させたものを本アッセイ系におけるバックグランドとする方法を確立した。この方法を用い、一定濃度の 1 における反応処理後の経過時間と遊走子遊泳停止活性および遊走子細胞溶解誘導活性との関係を調べ、 1×10^{-6} M 濃度で前者が 20-40 分、後者が 1 時間から 3 時間の間で明らかな直線性を示す結果を得た。

化合物 1, 2, 3, 4 および 1-c の *A. cochlioides* 二次遊走子に対する遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を比較し、両活性とも 1-c > 1 > 4 > 2 > 3 の順に低下することを明らかにした。遊泳停止活性および細胞溶解誘導活性を発現するためには、遊離のカルボキシル基 (-COOH) および適当な長さをもち少なくとも 1 箇所の炭素炭素間二重結合が存在するアルキル側鎖が必要であり、芳香環上にある分子内水素結合性のフェノール水酸基はこれらの活性には寄与せず、むしろメチル化によって完全にキャップされた化合物 1-c の方が活性の増大を認めた。また、化合物 4 と 1 の混合物で、1 あるいは 4 単独に比べ、相乗的な活性上昇を認めた。これにより、それぞれの作用機構が異なるとの推測を与えた。

3) 各種 anacardic acid 誘導体の抗細菌活性を寒天平板上、ペーパーディスク法で検定したところ、化合物 1 および 1-c はそれぞれ 3.12 μ g/disc および 1.56 μ g/disc で *Bacillus subtilis* に対する抗細菌活性を示した。その他の誘導体は 200 μ g/disc でもほとんど活性を示さなかったことから、殺遊走子活性と抗グラム陽性細菌活性との間の正相関を見いだした。

4) anacardic acid 処理した遊走子で誘導される細胞傷害過程の走査型電子顕微鏡による観察を行った。これにより、anacardic acid 類に曝露された遊走子は、初期反応として鞭毛の崩壊がまず引き起こされ、被のう胞子への形態変化を経ずに、細胞表層の特定部位の崩壊が認められた。その後、細胞内容物が放出されて細胞の完全な溶解に至った。この観察から、anacardic acid 類の作用部位は鞭毛および細胞膜にあり、細胞表層の崩壊は鞭毛基部付近から開始する可能性を指摘した。

以上のように、anacardic acid 類の *A. cochlioides* 二次遊走子に対する遊泳停止活性と引き続いて認められる細胞溶解誘導活性は、単純な界面活性作用に起因するのではなく、遊走子に特異的な作用によることを明らかにした。本研究は、卵菌遊走子の感染に起因する、多くの土壌伝

播性植物感染症の生物合理的防除に、新たな方向性を示す結果を包含している。

よって審査員一同は、バルビン ベガウムが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。