

学位論文題名

Studies on novel toxins from a plant pathogen  
*Lasiodiplodia theobromae* and its  
antagonistic organism *Penicillium expansum*

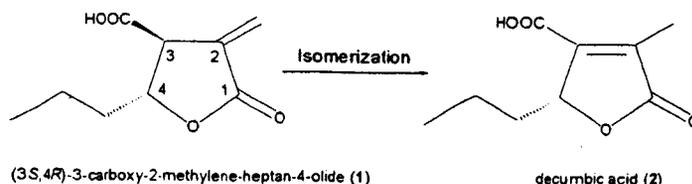
(植物病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* 及び  
その拮抗微生物 *Penicillium expansum* の新規毒素に関する研究)

学位論文内容の要旨

*Lasiodiplodia theobromae*は熱帯地方および亜熱帯地方によく見られる病原菌である。この病原菌は、貯蔵されている果物および根菜類に感染し多数の種類 of 疾病を引き起こし、重大な経済的影響を及ぼすことが知られている。この病原菌の特徴として毒素を生成することが分かっており、*L. theobromae* によって生産された毒素の研究は、病因の解明と疾病の予防において非常に重要である。また、毒素の発見は耐疾病性の植物を探すことにおいても大きな役割を担っている。現在、病原菌に対する生物学的な防除法が注目されているため、病原菌を有効にコントロールすることによって疾病を予防することは環境に優しい理想的な方法であると言える。多くの研究によって、病原菌の拮抗微生物が生成した抗生物質が病原菌の抑制に関係していることが示されている。その抗生物質を単離、構造解析することは拮抗微生物の作用メカニズムを解明するにあたって非常に重要であり、新しい抗真菌剤合成にとっても重要な役割を担っている。そこで、本研究では病原菌 *L. theobromae* からの毒素の単離、構造解析、及びこの病原体の拮抗微生物である *Penicillium expansum* からの抗生物質の単離、構造解析を目標に研究を行った。これらの化合物の構造と活性の相関が解明された。

1 *L. theobromae*からの新規毒素の単離

供試病原菌は宮古島で罹病したマンゴーの枝から分離された。毒素検出の生物検定には、バナナに針で穴を開け、そこに試料をのせて、病斑形成の有無を測定する方法を用いた。活性のあった酢酸エチル抽出部を、シリカゲルカラムで精製を繰り返し、さらにHPLCで精製し化合物1単離した。MS, IR, NMR, 2次元-NMR (HMQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COASY) などの解析により、化合物1は新規化合物 (3*S*, 4*R*) 3-carboxy-2-methylene-heptan-4-olide と決定された。HPLCによって精製している間に化合物1は decumbic acid (2) に転化することが分かった。

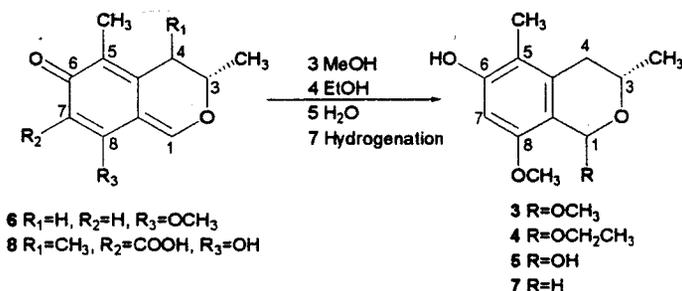


18  $\mu\text{g}$  の化合物1を用いてバナナの表面に注入すると、顕著な表面腐敗活性を示した。一方で、単離された decumbic acid (2) は活性を示さなかった。化合物1は decumbic acid (2) と二重結合の位置が異なる。実際にこの毒素(1)は通常条件でも二重結合の位置の異性化が起り、decumbic acid (2) になることが分かった。

この病原菌をバナナの表面に接種し、3日後に腐敗したバナナを酢酸エチルにて抽出した。抽出液から1が単離されたため、*L. theobromae*は果物の中にこの毒素を蓄積することが示された。このことにより *in vitro* と *in vivo* 両方において腐敗を引き起こす化合物1を単離することに成功した。 $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones類化合物は様々な抗菌活性や抗腫瘍活性を持っており、オレフィンの二重結合が $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones類の抗生物質の活性中心であるということが、sulfhydryl受容体と反応することによるということが解明されている。化合物1が decumbic acid に変換された時、毒性が消失したことにより、 $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactonesの活性は $\alpha$ -exomethyleneラクトン構造に由来することが示唆された。同じく、exomethyleneユニットが化合物1の腐敗を引き起こす活性中心であると考えられる。この新しい毒素の発見により *L. theobromae*の病因が明らかになった。また、この病原体による腐敗を防ぐことも可能になる。

## 2 *P. expansum*からの新規抗菌毒素の単離

*L. theobromae*に対する抗菌活性を指標として、*P. expansum*培養液の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムを用いて精製した。得られた活性画分は、それぞれメタノールおよびエタノールで結晶化を行い、白色結晶として化合物3および4が得られた。これらの化合物はMS, IR, および各種NMRスペクトルデータから、6-hydroxy-1,8-dimethoxy-3,5-dimethylisochroman (3)および1-ethoxy-6-hydroxy-8-methoxy-3,5-dimethylisochroman (4)と推定され、その構造から3および4は同じ化合物のメタノールおよびエタノール付加化合物と考えられた。*P. expansum*の培養液中に化合物3および4の出発物質となる化合物が存在するの否か確認するため、非アルコール性有機溶媒のみを用いて培養液の精製を試みた。その結果、化合物5、6および7が単離された。化合物6は4,6-dihydro-8-methoxy-3,5-dimethyl-6-oxo-3H-benzopyranと決定した。化合物5の構造は間接的に1,6-dihydroxy-8-methoxy-3,5-dimethylisochromanと推定された。単離された化合物をそれぞれ比較すると6は明らかに不安定であり、精製過程で容易にメタノール、エタノールまたは水と反応し、新規化合物3、4および5が生成したものと推察される。



続いて、これらの化合物の立体化学について検討した。化合物3のC-3位は開環反応を経た後、改良Mosher法により*S*と決定した。従って、4と6のC-3位も*S*と決定した。さらに、NOE差スペクトルから4と5は、いずれも1*S*および3*S*であることが明らかとなった。

本菌の主要な代謝産物の一つである7は化学的方法により、その絶対構造が決定された。6のエタノール付加物である4は培養液1リットル当たり約180 mg単離され、6が *P. expansum*の主要な抗菌化合物と示唆された。

化合物3、4および6の *L. theobromae*に対する菌叢成長阻害活性 (100  $\mu$ g/ml) は、それぞれ76%, 74%および69%であった。しかしながら、7は同濃度で10%以下の阻害活性しか認められなかった。化合物6の類縁化合物であるcitrinin (8)は抗菌活性試験中に dihydrocitrininに誘導されることが知られていることから、同様なメカニズムにより6も抗菌活性試験中に、その一部が7に変換されるものと思われる。構造活性相関の観点からすると、6の誘導體である3、4および7の抗菌活性がそれぞれ異なっていることは大変興味深いものであり、その解明は *L. theobromae*の防除に非常に有用であると思われる。

る。また、化合物6はcitirninと構造が類似しているので、同じ生合成経路を経て生成されると予想され、citrininと同様に多様な生物活性を有するものと推定される。

以上の結果をまとめると、*L. theobromae*およびその拮抗微生物*P. expansum*の培養液中から2種の新規化合物とその誘導体が見出された。これらの抗菌物質は*L. theobromae*の腐敗を引き起こすメカニズムの解明および、その病害の予防に資するものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 吉原 照彦  
副査 教授 田原 哲士  
副査 教授 生方 信  
副査 助教授 松浦 英幸

学位論文題名

## Studies on novel toxins from a plant pathogen *Lasiodiplodia theobromae* and its antagonistic organism *Penicillium expansum*

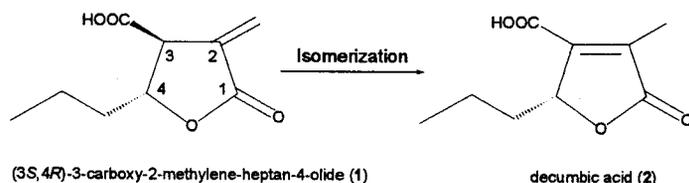
(植物病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* 及び

その拮抗微生物 *Penicillium expansum* の新規毒素に関する研究)

*Lasiodiplodia theobromae* は熱帯地方および亜熱帯地方に広く見られる病原菌である。この病原菌は生育している植物に感染し、多数の種類 of 疾病を引き起こすのみならず、貯蔵されている果物および根菜類にも感染し腐敗をもたらす。現在、病原菌に対する生物学的な防除法が注目されている。病原菌を生物学的にコントロールすることによって疾病を予防することは環境に優しい理想的な方法であると言える。多くの研究によって、病原菌の拮抗微生物が生成した抗生物質が病原菌の抑制に関係していることが示されている。本研究では病原菌 *L. theobromae* からの毒素の単離、構造解析、及びこの病原体の拮抗微生物である *Penicillium expansum* からの抗生物質の単離、構造解析を目標に研究を行った。

### 1 *L. theobromae* からの新規毒素の単離

供試病原菌は宮古島で罹病したマンゴーの枝から分離された。毒素検出の生物検定には、バナナに針で穴を開け、そこに試料をのせて、病斑形成の有無を測定する方法を用いた。*L. theobromae* は PD 培地で培養を行い、培養濾液を酢酸エチルで抽出を行い活性のあった酢酸エチル抽出部を、シリカゲルカラムで精製を繰り返し、さらに HPLC で精製し化合物 1 を単離した。MS, IR, NMR, 2 次元-NMR (HMQC, HMBC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) などの解析により、化合物 1 は新規化合物 (3*S*, 4*R*) 3-carboxy-2-methylene-heptan-4-olide と決定された。HPLC によって精製している間に化合物 1 は decumbic acid (2) に転化する。

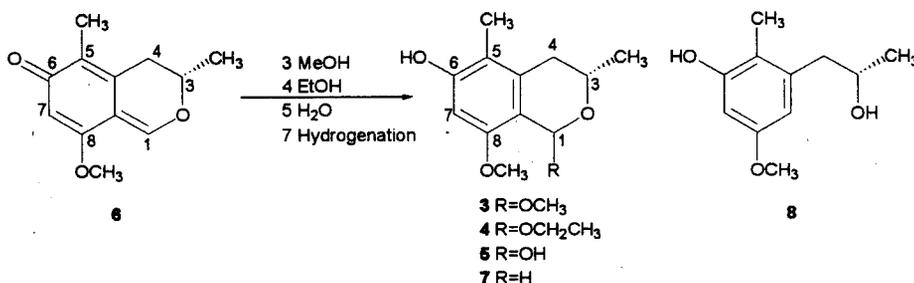


18  $\mu\text{g}$  の化合物 1 を用いてバナナの表面に注入すると、顕著な表面腐敗活性を示した。一方で、単離された 2 は活性を示さなかった。

この病原菌をバナナの表面に接種し、3日後に腐敗したバナナを酢酸エチルにて抽出した。抽出液から1が単離されたため、*L. theobromae*は果物の中にこの毒素を蓄積することが示された。このことにより *in vitro*と *in vivo*両方において腐敗を引き起こす化合物1を単離することに成功した。 $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactones類化合物は様々な抗菌活性や抗腫瘍活性を持っている。exomethyleneがsulfhydryl受容体と反応することにより活性を発現することが解明されている。

## 2 *P. expansum*からの新規抗菌毒素の単離

*L. theobromae*に対する抗菌活性を指標として、*P. expansum*のPD培養液の酢酸エチル抽出物をシリカゲルカラムを用いて精製した。得られた活性画分は、メタノールおよびエタノールで結晶化を行ったところ、白色結晶の化合物3および4が得られた。これらの化合物はMS, IR, および各種NMRスペクトルデータから、6-hydroxy-1,8-dimethoxy-3,5-dimethylisochroman (3)および1-ethoxy-6-hydroxy-8-methoxy-3,5-dimethylisochroman (4)と決定した。その構造から3および4は同じ化合物のメタノールおよびエタノール付加化合物と考えられた。*P. expansum*の培養液中に化合物3および4の出発物質となる化合物が存在するの否か確認するため、非アルコール性有機溶媒のみを用いて培養液の精製を試みた。その結果、化合物5、6および7が単離された。化合物6は4,6-dihydro-8-methoxy-3,5-dimethyl-6-oxo-3H-benzopyranと決定した。化合物5の構造は1,6-dihydroxy-8-methoxy-3,5-dimethylisochromanと推定された。単離された化合物を



それぞれ比較すると6は明らかに不安定であり、精製過程で容易にメタノール、エタノールまたは水と反応し、新規化合物3、4および5が生成したものと推察される。

続いて、これらの化合物の立体化学について検討した。化合物3を酸性条件下で処理すると8を生じた。開環反応物8の立体化学は改良Mosher法により*S*と決定した。さらに、3のNOE差スペクトルからC-3位のCH<sub>3</sub>とC-1位のOCH<sub>3</sub>はシスの関係にあることが明らかになり、C-1位の立体配置を*S*であると決定した。

6のエタノール付加物である4は培養液1リットル当たり約180 mg単離され、6が*P. expansum*の主要な抗菌化合物と示唆された。

化合物3、4、6および7の*L. theobromae*に対する菌叢成長阻害活性 (100  $\mu$ g/ml) は、それぞれ76%, 74%, 69%および10%以下であった。

以上の結果をまとめると、*L. theobromae*およびその拮抗微生物*P. expansum*の培養液中から2種の新規化合物とその誘導体が見出された。これらの抗菌物質は*L. theobromae*の腐敗を引き起こすメカニズムの解明および、その病害の予防に資するものと思われる。よって審査員一同は何国春が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。