

学位論文題名

Studies on Antimicrobial Characteristics of Giant Knotweed  
*Polygonum sachalinense* against Fish Pathogen  
*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

（魚類病原細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* に対する  
オオイタドリ *Polygonum sachalinense* の抗菌作用に関する研究）

学位論文内容の要旨

食生活における健康志向の増大と食品に対する消費者の関心の高まりに伴い、食品添加物の低減は勿論のこと特定保健用食品の増加等、健康への機能性が付与された食品にも注目が集まっている。殊に原料となる食材においては狂牛病（BSE）発生以後、トレーサビリティ（生産流通履歴情報）システムが採用されたことをきっかけに、生鮮食料品に関しても安心・安全を求める傾向は強くなってきた。

外洋における水産魚介類の漁獲量は減少の傾向をたどり、国内外を問わず流通上における新鮮な魚介類の安定供給において養殖産業の担う役割は非常に大きい。現在、我が国においては魚介類生産の約 3 割が養殖による生産となっている。養殖場において魚病の発生は経済的損失に直結することから、病気を発生させぬよう細心の注意が払われており、魚類感染症の治療には水産庁の指導のもと抗生物質や殺菌剤等の水産医薬品が厳格な規制のもとで使用されている。ところが不幸にして薬剤耐性菌の発生を招く場合も多い。*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* はブリの類結節症原因菌として知られる魚類病原細菌であるが、各種抗生物質に対し耐性となる頻度が高く、日本をはじめ欧米においても本菌が原因で引き起こされる類結節症は多数報告されている。また本感染症に有効なワクチンの開発が試みられてはいるが、日本では未だ実用化されるまでには至っておらず、この重篤な感染症に対し新たな抗菌剤の探索やワクチン開発が急がれているのが現状である。近年では、環境負荷が少ないというメリットから天然物、特に植物の抗菌作用に注目し利用しようという機運が高まりつつある。そこで本研究では、各種の

野生植物の抽出物の抗菌活性評価から本病原菌に対する有効な植物抽出物の抗菌作用機構の解明と、それに含まれる主要抗菌成分の同定を試みた。

第1章では、函館市内で採取した植物20科39種を採取し、それらの熱水抽出物の抗菌スペクトルについて *Ph. damsela* subsp. *piscicida* を含む各種細菌20種26株に対して評価した。漢方薬及び民間薬に使用されている植物が抗菌活性を示す傾向が認められたが、タデ科の多年草であるオオイタドリ (*Polygonum sachalinense* F. Schmidt. ex Maxim.) 根茎の抽出物はほぼ全ての菌株に対し発育阻害活性を示した。また、本植物根茎のメタノール抽出物を水と数種の有機溶媒に対して分配し得られた画分のうち、酢酸エチル画分は最も強い抗菌活性を示した。このメタノール抽出物及び酢酸エチル画分の魚類病原細菌7種14株に対する抗菌スペクトルを最小発育阻止濃度 (MIC) から評価したところ、特に *Ph. damsela* subsp. *piscicida* に対し強い活性を示すことが確認された (それぞれ MIC 50-100, 25-50  $\mu\text{g/ml}$ )。

第2章では、オオイタドリ根茎抽出物の酢酸エチル画分の *Ph. damsela* subsp. *piscicida* に対する抗菌作用機構を検討した。本抽出画分を液体培地 (Brain Heart Infusion broth, BHI) に 100  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で添加すると培養後8時間以内に生菌数 ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) を検出限界値以下 ( $<1 \log$  CFU/ml) にまで減少させたが、Propidium iodide の取り込み能に変化がないことから、細胞膜損傷を誘起していないことが示唆された。本抽出画分の添加によって、膜電位感受性蛍光プローブ 3, 3'-dipropyl-2, 2'-thiadiazocarbocyanine iodide [DiSC<sub>3</sub>(5)] を用いて測定した細胞膜電位 ( $\Delta\psi$ ) は顕著に低下し、また、5 (and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester [cFDASE] を用いて測定した細胞内外 pH 勾配 ( $\Delta\text{pH}$ ) を不安定化させる等、pH 恒常性に対して影響を及ぼし、メチレンブルー脱水素酵素の活性変化からも抽出画分の濃度の上昇とともに細胞の呼吸能が低下することが明らかとなった。

抽出画分中の成分は本対象菌の菌体表面に吸着し、濃度依存的にその吸着量は増大する傾向を示し、このとき、菌体の細胞表面疎水性の顕著な低下が認められた。また、本菌はタンパク質やリポ多糖よりなる細胞外生成物 (ECP) を産生し、それが魚類に対して毒性を有することが報告されている。菌体の処理時における抽出物濃度の増大に伴い菌体から分泌されるタンパク質性物質の明らかな減少が観察された。本菌の培養上清

中にはシアル酸、L-フコースを含む糖タンパク質も通常存在するが、これらも抽出物処理により検出されなくなった。*Ph. damsela* subsp. *piscicida* は約 9.7 kDa と 6.1 kDa の莢膜多糖類を有するが、抽出画分による処理によって上清中に糖の増加が認められず、莢膜の脱離作用はないものと考えられた。また、菌体から抽出した脂質で蛍光色素 5 (and 6)-carboxyfluorescein [cF] を取り込ませたりポソームを調製し抽出画分を作用させた場合、cF の漏洩はほとんど観察されず、これらの結果からも抽出物が菌体細胞構造の崩壊を招いているものではないことが示唆された。

本病原細菌が宿主細胞に感染する際、菌体表面疎水性や ECP、莢膜多糖類が重要な働きをすることは指摘されているが、本研究において観察された菌体表面における抽出画分の吸着によって引き起こされた菌体表面疎水性の減少及び ECP 量の減少は、オオイトドリ抽出物が供試菌の感染性に影響を及ぼしている可能性を示している。

酢酸エチル抽出画分には、フェノール性化合物が約 80 % と多く、その他脂肪酸と糖類も検出された。これらの成分が細菌細胞に吸着もしくは膜タンパク等との結合に関与し、細胞膜電位 ( $\Delta\psi$ )、pH 濃度勾配 ( $\Delta\text{pH}$ ) に影響を与え細胞内外のイオン濃度勾配を攪乱し ATP 合成の阻害等、細胞膜機能の崩壊に伴う細胞の恒常性の喪失により本画分は抗菌作用を発揮すると考えられた。

第 3 章では、酢酸エチル抽出画分から主要抗菌活性成分の単離と同定を試みた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako gel C-100) で分画された高抗菌活性画分、F2 (ヘキサン-酢酸エチル= 20: 80, v/v) 画分を高速液体クロマトグラフィー (LiChrosorb RP-18, メタノール-水-酢酸系溶離) に供し、強く抗菌活性を示した成分及びその類縁と考えられる成分それぞれ、化合物 1 及び 2 を得た。両者とも薄茶色の粉末状で、紫外部吸収スペクトルは 200, 230sh, 298sh, 316 nm に極大を示し高分解能 FAB-MS スペクトルにより 1 は [M]<sup>-</sup>  $m/z$  998.2899 から  $\text{C}_{51}\text{H}_{50}\text{O}_{21}$  (理論値 998.2844)、2 は [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  957.2828 から  $\text{C}_{49}\text{H}_{48}\text{O}_{20}$  (理論値 956.2817) と分子式を決定した。さらに 1D 及び 2D (COSY, HMBC, HSQC, ROESY) NMR スペクトル解析から、1 及び 2 はそれぞれフェニルプロパノイド配糖体である Vanicoside A 及び B であると同定された。Vanicoside A, B は既知物質であるが、本植物からの単離は今までに報告されておらず本研究で初めて明らかとなった。

単離された Vanicoside A 及び B の *Ph. damsela* subsp. *piscicida* に対する抗菌作用を検討したところ、薬剤耐性株を含む臨床分離株に対し 32-64  $\mu\text{g/ml}$  の MIC を示した。

Vanicoside A 及び B は *Ph. damsela* subsp. *piscicida* DPp-1 の細胞膜電位 ( $\Delta\psi$ ) を低下させ、特に前者の方がより  $\Delta\psi$  を低下させた。また両者とも  $\beta$ -グルコシダーゼ阻害活性も併せ持つことが明らかとなった。

以上のように、本研究では、魚類病原細菌 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* の薬剤耐性株を含む分離株に対し、オオイタドリ根茎の抽出物およびその酢酸エチル分配画分が比較的に強い抗菌活性を有することを見い出した。本抽出画分は含有成分が菌体に吸着し細胞膜の恒常性を乱すことにより細胞死を導くことが示唆されたが、その抗菌作用の発現には画分中に共存する各種成分の協同的作用も関与していると考えられる。また、酢酸エチル画分中の抗菌活性成分としてフェニルプロパノイド配糖体である Vanicoside A 及び B が同定された。これらの成分により魚類病原細菌 *Ph. damsela* subsp. *piscicida* を効果的に抑制できる可能性が明らかとなり、類結節症の予防、治療の一助となることが期待される。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 猪 上 徳 雄  
副 査 教 授 吉 水 守  
副 査 助 教 授 川 合 祐 史  
副 査 助 教 授 栗 原 秀 幸

学 位 論 文 題 名

### Studies on Antimicrobial Characteristics of Giant Knotweed *Polygonum sachalinense* against Fish Pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

(魚類病原細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* に対する  
オオイタドリ *Polygonum sachalinense* の抗菌作用に関する研究)

本研究では、養殖魚類の健全性の維持のために抗菌物質を含有する植物抽出物を活用することを目的として、各種の野生植物の抽出物の抗菌活性評価から特にブリ類結節症原因細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* に対して有効な植物抽出物の抗菌作用機構とそれに含まれる主要抗菌物質について検討している。

まず、函館市内で採取した野生植物20科39種の熱水抽出物の抗菌スペクトルについて、各種細菌20種26株に対して評価した。漢方薬及び民間薬に使用されている植物が抗菌活性を示す傾向が認められたが、タデ科の多年草であるオオイタドリ (*Polygonum sachalinense* F. Schmidt ex Maxim.) 根茎の抽出物はほぼ全ての菌株に対し発育阻害活性を示した。また、本植物根茎のメタノール抽出物の水と各種有機溶媒による分配によって、抗菌活性は酢酸エチル分配画分に多く分配されることを明らかにした。このメタノール抽出物及び酢酸エチル画分の魚類病原細菌7種14株に対する抗菌スペクトルを評価したところ、特にブリの類結節症原因細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* に強い活性を示すことを確認し、酢酸エチル画分は本菌の抗生物質耐性株に対しても一様に抗菌作用を示すことを明らかにした。

次に、オオイタドリ根茎抽出物の酢酸エチル画分の *Ph. damsela* subsp. *piscicida* に対する抗菌作用機構を検討した。本抽出画分をBHI液体培地に100  $\mu$ g/ml以上の濃度で添加すると本菌の生菌数は培養後8時間以内に顕著に減少す

ることを観察した。本抽出画分の添加は、本菌の細胞膜電位を顕著に低下させ、また、細胞内外pH勾配を不安定化させる等、pH恒常性に対して影響を及ぼし、メチレンブルー脱水素酵素の活性変化からも抽出画分の濃度の上昇とともに細胞の呼吸能が低下することを明らかにした。

抽出画分中の成分は本対象菌の菌体表面に濃度依存的に吸着する傾向を示し、このとき、菌体の細胞表面疎水性の顕著な低下とタンパク質やリポ多糖よりなる細胞外生成物(ECP)や莢膜多糖類などに由来する成分の遊離量は減少するため、オオイタドリ抽出物が供試菌の感染性に影響を及ぼしている可能性を指摘している。また、本抽出画分による処理によって本対象菌のヨウ化プロピジウム取り込み能に変化がなく、菌体から抽出した脂質で調製したリポソームを破壊しないことから、菌体細胞膜構造の大きな損傷を伴わないことも示唆している。

したがって、根茎の酢酸エチル抽出画分の本対象菌に対する抗菌作用機構は、含有される抗菌成分が細菌細胞に吸着もしくは膜タンパク等との結合に関与し、細胞膜電位、pH濃度勾配に影響を与え細胞内外のイオン濃度勾配を攪乱しATP合成の阻害等、細胞膜機能の崩壊に伴う細胞の恒常性の喪失によることを解明した。本抽出画分にはフェノール性化合物が約80%含有され、抗菌作用の発現には画分中に共存する各種成分の協同的作用も関与することを指摘している。

酢酸エチル抽出画分からは主要抗菌活性成分の単離と同定を試みている。根茎の酢酸エチル抽出画分から、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako Gel C100) と逆相高速液体クロマトグラフィー (LiChrosorb RP-18) によって、強い抗菌活性を示す成分及びその類縁と考えられる成分それぞれ、化合物1及び2を分離した。両者とも薄茶色の粉末状で、紫外部吸収スペクトルは、200、230sh、298sh、316nmに極大を示し、高分解能FAB-MSスペクトルにより、1は[M]<sup>-</sup> *m/z* 998.2899 から C<sub>51</sub>H<sub>50</sub>O<sub>21</sub> (理論値998.2844)、2は[M+H]<sup>+</sup> *m/z* 957.2828 から C<sub>49</sub>H<sub>48</sub>O<sub>20</sub> (理論値956.2817)と分子式を決定した。さらにNMRスペクトル解析から、1及び2はそれぞれフェニルプロパノイド配糖体 Vanicoside A、Bと同定した。これらは既知物質であるが、抗菌作用と本植物からの単離については今までに報告されておらず本研究で初めて明らかにされたものである。

単離されたVanicoside A及びBは、*Ph. damsela* subsp. *piscicida* の薬剤耐性株を含む分離株に対し、細胞膜電位を低下させ、一様に抗菌作用を示すことを確認した。また両者ともβ-グルコシダーゼ阻害活性も併せ持つことを明らかにした。

本研究の成果は、タデ科植物オオイタドリから初めて抗菌物質を単離し、本植物抽出物の機能を利用して魚類病原細菌を制御することにより、養殖魚の健全性確保と安定供給の分野に貢献するものとして高く評価できる。よって審査員一同は、本論文が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。