

## 論文の内容の要旨

生物材料科学専攻

平成9年度博士課程 進学

氏名 澁谷 栄

指導教官名 佐分義正

論文題目 針葉樹樹皮抽出成分の抗菌性に関する研究

### 1. 緒言

現在木材利用における副産物である背板、鋸屑、樹皮などの廃棄物は以前に比べて多くリサイクルされるようになった。背板及び鋸屑などの再利用率はほぼ100%に相当する。樹皮についても以前に比べて再利用率が高くなってはいるものの他の廃棄物に比べて再利用率が低い。樹皮は特徴として植物体の他の部位よりも抽出成分を多く含有していることが知られているが、再利用の場合においては障害となることが多い。しかしながら抽出成分は様々な構造を取ることからも推測されるように有益な生理活性を持つことも考えられる。そこで植物体の防御機能の一つと考えられる抗菌性に着目し、樹皮抽出成分の抗菌性について調べ、有効利用の検討を行った。

### 2. 日本産針葉樹樹皮抽出物の持つ抗菌性について

ヒノキ、スギ、アカマツ、トドマツ、アカエゾマツ、カラマツの間伐材から剥離した樹皮を風乾させたのちウィリーミルで粉碎し、それぞれ50gの樹皮粉試料を各500mLのn-ヘキサン、酢酸エチル、およびエタノールで逐次抽出を行って抽出物を得た。得られた抽出物を木材成分分解性の細菌 (*Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp.) および糸状菌 (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*) に対して抗菌試験を行い抗菌物質の検索を行った。細菌に対する抗菌性は寒天培地に、樹皮抽出物を加えて、抽出物を含まないコントロールのものとの比較により評価した。その結果、各抽出物の添加濃度0.1%, 0.01%で行った抗菌試験ではn-ヘキサン抽出物はいずれの樹種においても酢酸エチル及びエタノール抽出物に比べて、細菌に対して強い抗菌性を示した。次に、抽出物を培地に対して0.01%で添加した場合の抗菌試験の結果、明確な抗菌性を示したものは、アカエゾマツおよびヒノキのn-ヘキサン抽出物だけであった。分画と抗菌試験を行い抗菌性物質の検索を行ったところ、アカエゾマツのn-ヘキサン抽出物よりジテルペンカルボン酸である dehydroabietic acid (図1) を抗菌性物質として同定した。

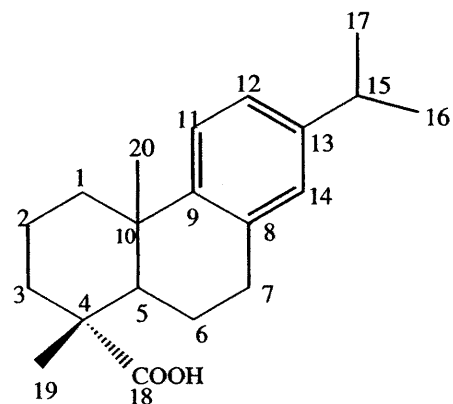
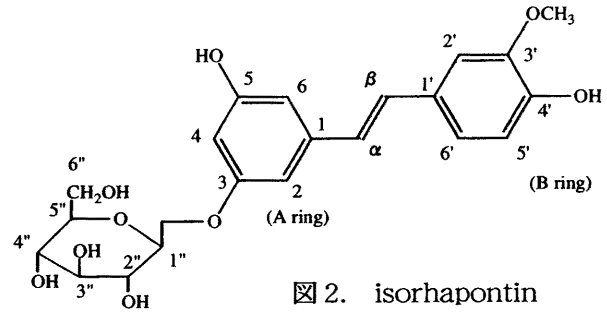


図1. dehydroabietic acid

また、糸状菌に対する抗菌性は寒天培地上に、抽出物 5 mg を含むペーパーディスク（直径 9.0 mm、厚さ 1.3 mm）を置き、菌糸の生育状況を観察し、ペーパーディスクが接触した寒天培地上に形成される生育阻止円の大きさ、およびディスク上での菌糸の生育状況によって評価した。糸状菌に対する抗菌試験では細菌や放線菌などに強い抗菌性を示した n-ヘキサン抽出物は、糸状菌 *P. chrysosporium* および *T. reesei* に対しては全く抗菌性を示さなかった。これと対称的に細菌、放線菌に抗菌性の弱かった酢酸エチル抽出物およびエタノール抽出物は糸状菌に対して明確な抗菌性を示した。特にアカエゾマツの酢酸エチル抽出物の抗菌性は顕著で、*P. chrysosporium* および *T. reesei* に対してそれぞれ直径 2.5 cm、2.3 cm の阻止円を形成させた。そこで、糸状菌に対する抗菌物質を検索したところ、アカエゾマツの酢酸エチル抽出物よりスチルベン配糖体である isorhapontin(図 2)を抗菌性物質として同定した。



### 3. MICROTOX™における樹皮抽出物の生物発光阻害効果

高感度の急性毒性の試験法として広く用いられている MICROTOX™ 試験は、発光細菌 *Photobacterium phosphoreum* の生物発光に対する阻害活性を利用したものである。本章では MICROTOX™ 試験を用いて樹皮抽出物の評価を行った。前述の樹皮抽出物各 1mg を 1mL のジメチルスルホキシドに溶解させ適宜希釈し、これを細菌懸濁液に添加し発光阻害について測定した。ここで、*P. phosphoreum* による発光量を、試験開始後 15 分間後に測定し、コントロールに対して 1/2 に減少させる試料濃度を EC50 (EC: Effective Concentration) として、これを次式  $TI_{50} = 100 / [EC_{50}]$  に代入して毒性指数 (TI: Toxicity Index) を求めた。試験の結果(図 3) いずれの樹種においても酢酸エチル抽出物よりも n-ヘキサン抽出物の方が強い生物発光阻害活性を示しており、さらに試供した樹種中ではトドマツとアカマツ樹皮から得た n-ヘキサン抽出物の TI50 値はそれぞれ 94.3, 86.2 であり、これらの抽出物の中に非常に強力な生物発光の阻害活性物質が存在することが明らかとなった。このうちトドマツ樹皮抽出物について原因物質の検索を行ったところ、主要な発光阻害物質はオレイン酸であると同定された。そこでオレイン酸およびその関連化合物による *P. phosphoreum* の生物発光の阻害活性を調べた結果、オレイン酸と同様に非常に強力な阻害活性を示したのは炭素数 18 の脂肪酸の中で cis 型の不飽和二重結合を 9 位に有する脂肪酸類であった。対称的に炭素数 18 の飽和脂肪酸でも飽和脂肪酸であるステアリン酸や、オレイン酸と同様に 9 位に不飽和二重結合を持つがカルボキシル基を有さないオレイルアルコールでは非常に阻害効果が低かった。また、パクセン酸、ペトロセリン酸といった 9 位以外の箇所に不飽和二重結合を有する炭素数 18 の他の脂肪酸や、9 位に不飽和二重結合を有するが trans 型であるエライジン酸でも、オレイン酸の場合に比べると活性は非常に弱いものであった。これらの結果から、脂肪酸における不飽和二重結合の存在、その位置ならびに立体配置の違い、ならびにカルボキシル基の存在が *P. phosphoreum* に対する発光阻害に非常に影響を与えることが判明した。さらに、試供した 6 種の樹皮の n-ヘキサン抽出物中のオレイン酸量について GC 分析により測定した。トドマツ及びアカマツ樹皮の n-ヘキサン抽出物中にはそれぞれ乾燥樹皮重量に対してに 2.4%, 4.0% のオレイン酸を含有していることが判明した。対称的に他の樹種の n-ヘキサン抽出物の GC 分析ではオレイン酸は検出されなかった。

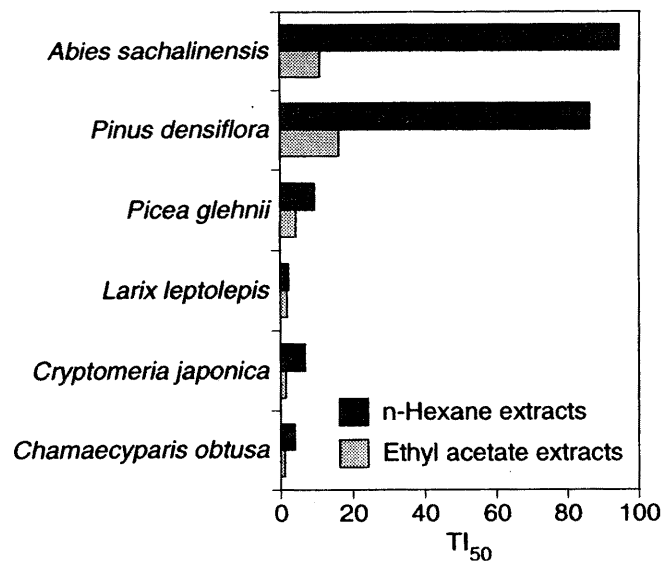


図 3. 樹皮抽出物の発光阻害効果

#### 4. スチルベン配糖体の糸状菌セルラーゼに対する阻害効果

タンニンタンパク質の沈殿能を持つが、樹皮抽出物中にはこのようなポリフェノールが多いことが知られている。本章では樹皮の酢酸エチル抽出物のセルラーゼに対する阻害性について調べた。0.1%微結晶性バクテリアセルロース(BMCC)、0.1%樹皮抽出物、0.1% *Trichoderma* セルラーゼとなるように試料液を調製し、30℃で1時間反応させた。反応液は遠沈して上澄みを取り、同量の水にBMCCを再懸濁させた。この再懸濁させたBMCCについて600nmの吸光度を測定して抽出物無添加のコントロールと比較を行い樹皮抽出物のセルラーゼに対する阻害性について検討した。図4に各樹皮抽出物を添加した時の分解性について示した。ここではアカエゾマツの樹皮抽出物の阻害効果が比較的大きいことが分かる。これまでにアカエゾマツ樹皮の酢酸エチル抽出物中にはスチルベン配糖体が多いことが知られている。そこで主成分である isorhapontin を精製し、*Trichoderma* セルラーゼの主要構成成分であるセロビオヒドロラーゼ I (CBH I) についての阻害効果について検討を行った。ここでは 1mM の isorhapontin の存在下で CBH I の基質に対する分解が明らかに阻害された。さらに isorhapontin の阻害効果をセロヘプタイトールの加水分解について定量的に観察を行った。ここでは CBH I の加水分解によって生じた還元末端を CDH で酸化し、これを Cyt. c の吸光度の変化で検出することにより定量を行った。この結果は図5-Aに示したように CBH I の活性が isorhapontin の濃度の増加に伴い減少していることが分かる。図5-Bの Lineweaver-Burk のプロットから CBH I に対する isorhapontin の阻害効果は不拮抗非拮抗混合型の阻害であると推定された。また 250  $\mu$ M の isorhapontin の存在下で3種のエンドグルカナーゼ (EG I, EG II, EG III) に対しても阻害効果の検討を行った。その結果、阻害効果を示したのは CBH I および EG I についてであった(図6)。CBH I および EG I は hydrophobic cluster analysis により Family 7 に分類されることが知られている。このことからスチルベン配糖体のセルラーゼに対する阻害効果が Family 7 に特異的なものであると考えられた。

#### 5. アカエゾマツ樹皮由来のスチルベンの抗カビ性について

日本産のアカエゾマツの樹皮中に含まれるスチルベン配糖体は含有量が乾燥樹皮重量の約10%と特異的に多く、糸状菌 *Phanerochaete* および *Trichoderma* に対して寒天培地上で生育抑制効果を示すことが分かっている。このような天然物を防カビ剤として利用できれば資源的および環境的にも非常に有効ではないかと考えられる。そこで本研究では糸状菌 *Trichoderma* を用いて培養を行い、抗菌性の原因物質として同定したスチルベン配糖体の代謝と菌の生育について調べ、効果的な抗菌性の発現について検討を行った。本研究で用いた糸状菌は *Trichoderma viride* IAM 5141 である。なお、より明確に抗菌性の認められる *Phanerochaete chrysosporium* K-3、を対照として用いた。糸状菌の培養は液体培地で行った。

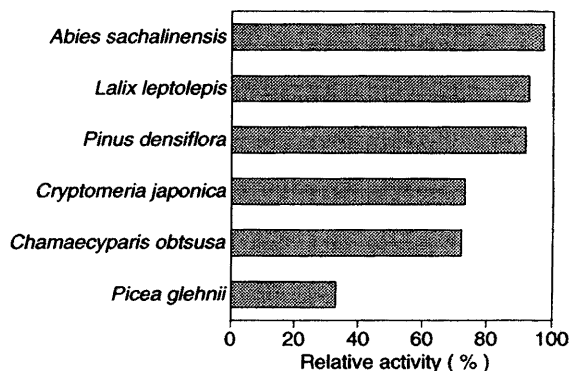


図4. 樹皮抽出物によるセルラーゼ活性の阻害

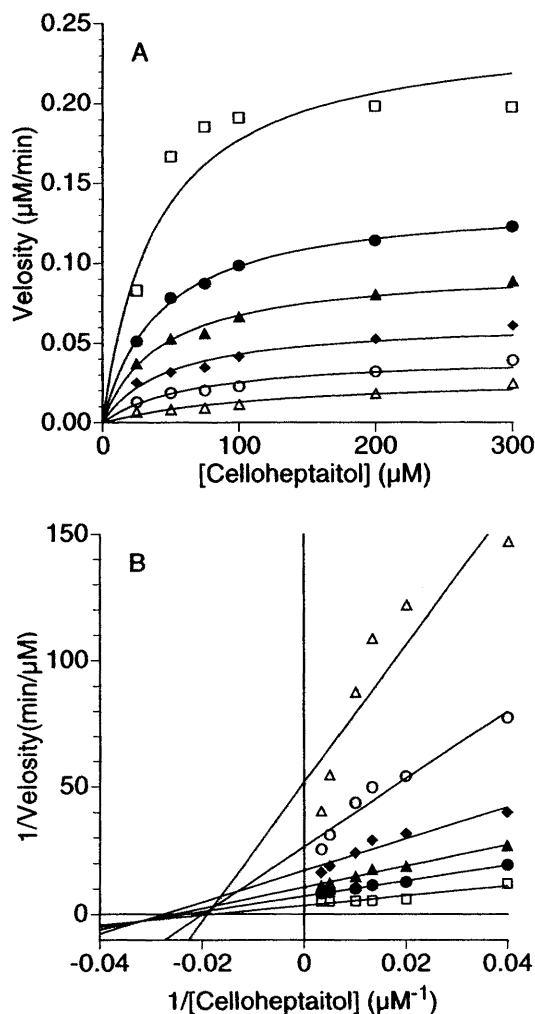


図5. isorhapontin による CBH I に対する阻害効果 (isorhapontin 濃度, □: 0  $\mu$ M, ●: 31.3  $\mu$ M, ▲: 62.5  $\mu$ M, ◆: 125  $\mu$ M, ○: 250  $\mu$ M, △: 500  $\mu$ M)

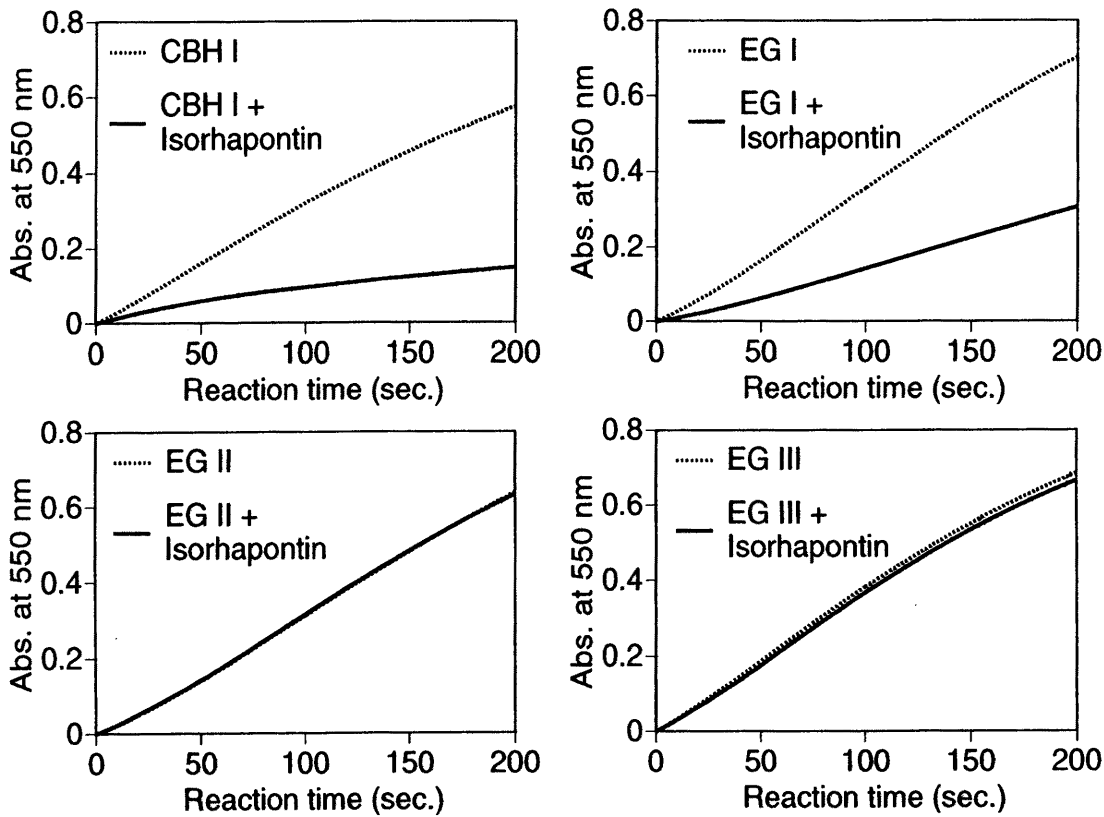


図6. エンドグルカナーゼに対する isorhapontin の効果(isorhapontin 250  $\mu$  M 添加)

作製した培地はオートクレーブを用いて滅菌を行ったのち、培養用試験管に10mLずつ分注し、胞子液によりそれぞれの菌を植え付けた。なお、スチルベン配糖体は最終濃度が1.0mg/mLとなるように溶解させた。培養した2種の糸状菌は1日ごとに生育状況の観察を行った。生育量はグラスフィルターを用いて培養液と菌体部分をろ別し、残さを回収して105°Cで絶乾とし菌体の乾燥重量として測定した。この菌体の重量は1日3検体を測定して平均重量をもとめた。培地中のスチルベン類の分析はろ別した培養液をHPLC分析して行った。配糖体添加における生育状況の観察では培養初期の段階において *P. chrysosporium* では生育抑制が認められたが、*T. viride* ではコントロールと同様の生育を示すことが分かった。液体培地のHPLC分析により、培養期間中の培地中のスチルベン配糖体は *P. chrysosporium* では早期にアグリコンへの変換が起こったが *T. viride* では培養後期にアグリコンへの変換が起こっていることが認められた。そこでアグリコンを用いて培養を行った時の *T. viride* の生育状況を図7に示した。*T. viride* に対して0.10mg/mLの添加濃度でコントロールに比べ生育抑制が認められるが、0.25mg/mLでは更に効果を示し、培養の期間を通じてほとんど生育が認められない。そこで配糖体と $\beta$ -グルコシダーゼの添加による *T. viride* の生育状況を検討した。ここでは配糖体のみを添加した場合と比較して明らかに生育阻害が示されることが認められた。この時の培地中のスチルベンの分析を観察したところ、1日目以降、配糖体の全体の70%はアグリコンに変換されており、これが培養期間を通じてほぼ持続したのが確認された。また、これまでの結果からアグリコンの濃度が低い時はアグリコンの分解が認められている。そこで抗菌性の持続のためにカテキン添加により低濃度のスチルベン(アグリコン)の分解の抑制を試みた。カテキン単独ではコントロールと同様の生育を示したが、アグリコンと同時にカテキンを添加したものではアグリコン単独のものよりも抗菌性が持続していることが明らかになった。

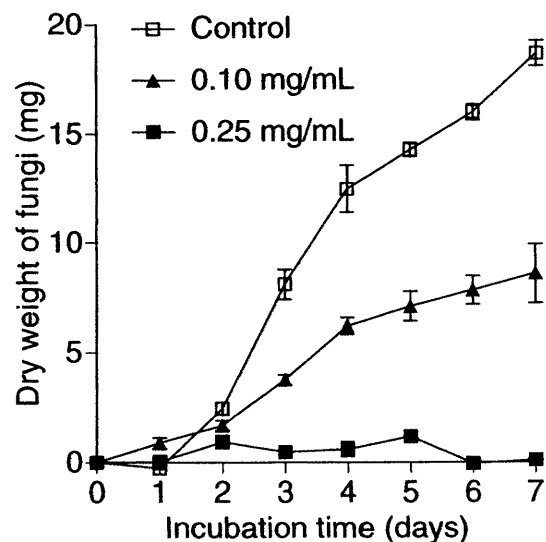


図7. アグリコン添加時の *T. viride* の生育状況