

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 福山 則明

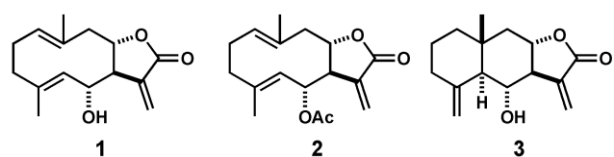
植物は微生物感染により生産が誘導されるファイトアレキシンや、恒常的に生産されるファイトアンチシピンといった様々な抗菌性二次代謝産物を生産している。植物がこれら抗菌化合物を生産する状況として主に地上部(葉や枝など)、地下部(根)、癒傷組織の 3 つが考えられる。地上部においては精油をはじめとするモノテルペンやセスキテルペンが蓄えられ、これらは抗菌・抗真菌・抗ウイルス活性や昆虫・軟体動物に対する忌避作用、摂食阻害作用を示すものであり、防御システムの役割を担っている。地下部においては、他の植物の生長の阻害や抗微生物活性を示すアレロパシー(他感作用)物質の地中への分泌が知られている。植物が傷ついた場合、傷口には癒傷組織として脱分化した細胞であるカルスが生じる。このカルスはファイトアレキシンやファイトアンチシピンを生産することが知られている。以上のような抗菌化合物の同定は、植物の各部位における防御機構の解明や臨床あるいは日常的に使用する抗菌化合物の新たな発見に繋がると考えられる。

福山はまず抗菌化合物の利用を目指し、精油成分を多く含むクスノキ科薬用植物からの歯周病原性細菌に対する抗菌化合物の単離を行った。さらに植物培養組織である培養細胞(液体培地に移植したカルス)と毛状根をそれぞれ癒傷組織と根のモデルとして捉え、それら植物培養組織からの抗菌化合物の探索を試みた。

1. ゲッケイジュの抗菌セスキテルペノイド

6種のクスノキ科薬用植物の葉と枝を材料として歯周病原性細菌 *Actinomyces viscosus* に対する抗菌活性を disk 法により検討したところ、ゲッケイジュ (*Laurus nobilis*) の葉にのみ活性が認められたため、これを材料として抗菌化合物の探索を進めた。

ゲッケイジュの葉をメタノールで抽出し、そのメタノールエキスを酢酸エチルと水で分配し、酢酸エチル層を減圧濃縮して酢酸エチル画分とした。同画分を材料として、*A. viscosus* に対する抗菌活性を指標にシリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相及び順相 HPLC により分離を進め抗菌化合物 **1** を単離した。この化合物 **1** は HR-FAB-MS より分子式 $C_{15}H_{20}O_3$ であり、NMR スペクトル、比旋光度は deacetyl laurenobiolide のそれらと同じ特徴を示した。また、化合物 **1** をアセチル化して得られたアセチル化体 **2** は HR-FAB-MS より分子式 $C_{17}H_{22}O_4$ であり、NMR スペクトル、比旋光度は laurenobiolide のそれらと同じ特徴を示した。化合物 **1** と **2** はともに複数のコンフォーメーションをとる化合物であり、NMR による解析が困難であった。そ



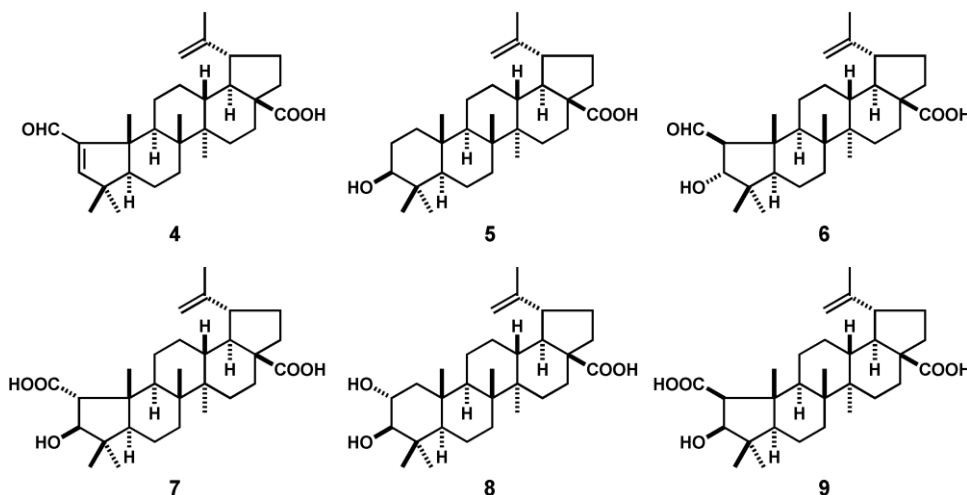
ここで NMR において単一のコンフォメーションのみのシグナルが得られることを期待し、化合物 **1** の閉環を試みた。化合物 **1** をクロロホルム中、塩酸で処理した化合物 **3** は単一のコンフォメーションのみのシグナルを与えた。これを HR-FAB-MS、1 次元及び 2 次元 NMR、改良 Mosher 法により解析し、新規化合物(5*S*,6*R*,7*S*,8*S*,10*R*)-6,8-dihydroxyeudesma-4(15),11(13)-dien- 12-oic acid 12,8-lactone (**3**) と決定した。以上より、化合物 **1**、**2** をそれぞれ deacetyl laurenobiolide、laurenobiolide と同定した。

これら化合物 **1-3** を用いて 4 種の歯周病原性細菌 (*Actinomyces viscosus*、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia*) に対する抗菌活性を検討した結果、いずれの化合物も 4 種全ての菌に対して抗菌活性を示した。また、化合物 **1-3** の歯周病原性細菌以外の抗菌活性を検討した結果、グラム陰性菌 *Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa* に対しては活性を示さないが、グラム陽性菌 *Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pyogenes*、真菌 *Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans*、*Aspergillus fumigatus* に対しては活性を示した。グラム陽性菌に対しては化合物 **2** が最も強い活性を示し、真菌に対しては化合物 **3** が最も強い活性を示した。

2. サネブトナツメ培養細胞の抗菌トリテルペノイド

11 科 11 種の薬用植物のカルスを材料として *S. aureus* (MSSA1 株) 及び *E. coli* に対する抗菌活性を検討したところ、クロウメモドキ科のサネブトナツメ (*Zizyphus jujuba* var. *spinosa*) カルスにのみ MSSA1 株に対する活性が認められたため、これを材料として抗菌化合物の探索を進めた。

DK 液体培地(2, 4-dichlorophenoxyacetic acid 1 mg/L、kinetin 0.1 mg/L 含有 Murashige & Skoog 培地)、25℃、暗所で回転振とう培養(100 rpm)したサネブトナツメ培養細胞をメタノールで抽出し、減圧濃縮後、酢酸エチルと水で分配し、酢酸エチル画分と水画分を得た。これらの MSSA1 株に対する抗菌活性を検討したところ、酢酸エチル画分に活性が認められた。同画分には TLC 分析において主に 6 つのスポットが検出された。これら検出された化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離し、化合物 **4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9** を得た。NMR スペクトル、LR-EI-MS、比旋光度の文献値との比較により、化合物 **4**、**5**、**6**、**7**、**8** をそれぞれ zizyberenalic acid、betulinic acid、zizyberanalic acid、ceanothic



acid、alphitolic acid と同定した。また、X 線結晶構造解析の結果より、**9** を *2-epi*ceanothic acid と決定した。

次に、これらの化合物の MSSA1 株に対する抗菌活性を検討したところ、**4**、**5** 以外は活性を示し、**6**、**7**、**8**、**9** の MIC はそれぞれ 125、125、63、63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、化合物 **6**、**7**、**8**、**9** は MRSA に、化合物 **6**、**7**、**9** はグラム陽性桿菌 *Bacillus subtilis* に、化合物 **7**、**8**、**9** は真菌 *Candida albicans* に対しても活性を示した。

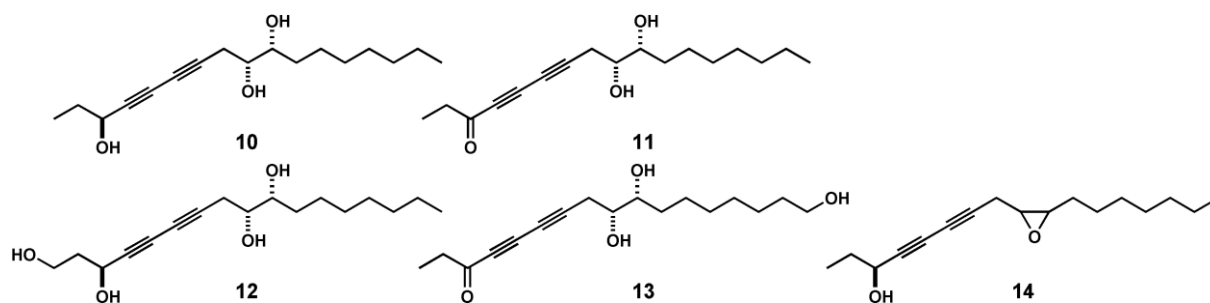
サネブトナツメ培養細胞は 4 週間の液体培養により 7.1 倍に増殖し、新鮮重量 199 g から **4** (67 mg)、**5** (49 mg)、**6** (56 mg)、**7** (61 mg)、**8** (27 mg)、**9** (48 mg) が得られた。サネブトナツメ培養細胞は母植物と比較し、これらトリテルペン酸類を非常に効率よく生産することが明らかとなり、サネブトナツメが癒傷組織においてこれら抗菌化合物を多量に生産していることが示唆された。

3. オタネニンジン毛状根の抗菌ポリアセチレン

液体培養下のオタネニンジン (*Panax ginseng*) 毛状根を材料として MSSA1 株に対する抗菌活性を検討したところ、毛状根抽出物は活性を示さないが、培地抽出物に活性が認められたことから、培地からの抗菌化合物の単離を進めた。

オタネニンジン毛状根は Murashige & Skoog 液体培地、25°C、暗所で回転振とう培養 (50 rpm) した。培地をクロロホルムで抽出し、減圧濃縮してクロロホルム画分を得た。この画分から逆相及び順相 HPLC により化合物 **10**、**11**、**12**、**13** を単離した。NMR スペクトル、LR-EI-MS、比旋光度の文献値との比較により化合物 **10**、**11** をそれぞれ dihydropanaxacol、panaxacol と同定した。化合物 **10** は 3 位の絶対立体配置が未決定であったので、9 位、10 位の水酸基をアセトナイドで保護したのちに改良 Mosher 法により解析し、3 位の絶対立体配置を *S* と決定した。また、NMR スペクトル、HR-ESI-MS の解析により化合物 **12** は 1-hydroxydihydropanaxacol、**13** は 17-hydroxypanaxacol とそれぞれ決定した。化合物 **12**、**13** は新規化合物である。化合物 **10**、**11**、**12**、**13** は MSSA1 株に対して抗菌活性を示し、MIC はそれぞれ 125、63、1000、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。さらに化合物 **10**、**11**、**12**、**13** は MRSA、グラム陽性桿菌 *Bacillus subtilis* や真菌 *Cryptococcus neoformans* に、化合物 **10**、**11** は *Aspergillus fumigatus* に対しても活性を示した。

さらに、毛状根のヘキササン抽出物からは順相 HPLC により化合物 **14** を単離した。NMR スペクトル、LR-EI-MS、比旋光度の文献値との比較により化合物 **14** を ginsenyne D と同定した。これは生合成における **10** の前駆体と考えられ、エポキシ環の開裂によるジオールの生成を経て毛状根から培地中に放出されることが予想される。オタネニジンは根からポリアセチレンを外部に放出することで自身を微生物から防御していると考えられる。



以上、福山は抗菌活性を指標としてゲッケイジュの葉から抗菌セスキテルペン **1** を単離し、さらにその構造変換物として **2**、**3** を得た。サネブトナツメ培養細胞からはトリテルペン酸 **4-9** を単離し、そのうち化合物 **6-9** に抗菌活性が認められた。オタネニンジン毛状根の培地から抗菌ポリアセチレン **10-13** を単離した。また、化合物 **10** の生合成上の前駆体と考えられる化合物 **14** を毛状根から単離した。

これらの結果は植物培養組織が有用二次代謝産物生産のツールとして有用なだけでなく、植物生理学の面からの利用を化学的に示したものであり、薬用植物学、天然物化学の進展に寄与するところが大きく、博士（薬学）の学位を授与するのに相応しいと判断した。