

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07503

研究課題名(和文) 樹木成分の自動酸化を利用した生理活性物質の合成

研究課題名(英文) Synthesis of bio-active products by autoxidation of tree components

研究代表者

芦谷 竜矢 (ASHITANI, Tatsuya)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：20423486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：未利用樹木成分のテルペン類の自動酸化反応を試み、生成物の生物活性について検討した。ロンギホレン、ツヨブセン等について加熱反応を試み、これまで得ていた反応生成物以外の生成物を確認し、反応機構を推定した。その他のテルペン類にも特徴的な自動酸化反応や異性化反応が見られたが、特にロンギホレンの反応機構についてエポキシドを中間体とする新たな知見が得られた。反応生成物の生物活性について、抗蟻、抗菌、抗藻類活性、植物生長抑制活性について新規なデータが得られた。各成分で加熱反応の方が室温での自動酸化よりも生理活性物質を効率よく与えることが示されたが、重合反応の抑制が今後の課題となることも示された。

研究成果の概要(英文)：Autoxidation of terpenoids, for example carophyllene, longifolene, thujopsene, and cembrene etc., was investigated to test the bio-activities of the reaction products. New autoxidation products were obtained from terpenoid autoxidation heated at 100-120 oC. Especially, as new knowledges for autoxidation mechanism, it was indicated that longifolene was converted into the autoxidation products via the formation of longifolene oxide as an intermediate. The bio-activities of the autoxidation products were tested on anti-termite anti-fungal, anti-algae activity and/or plant growth inhibitory activity. Most of autoxidation products had stronger activities for target organisms than original terpenoid before autoxidation. The bio-active products were obtained at a higher yield in the heating reaction than reaction at room temperature.

研究分野：森林化学

キーワード：テルペノイド 自動酸化 ヤマトシロアリ 木材腐朽菌 生理活性物質

1. 研究開始当初の背景

樹木は陸上の生物では二酸化炭素の吸収量が最大であり、再生可能な資源の一つとして知られている。樹木を利用し、植林によって林業/林産業を維持発展させることは、二酸化炭素の軽減にもつながり、人類の持続的な発展のためには不可欠であるといえる。しかしながら、樹木の製材時に発生する林産廃棄物としての樹皮や、枝葉等の林地残材として知られる廃材の量は膨大である。また、平成14年12月より焼却施設の規制も強化され、二酸化炭素発生量の抑制が問題になった近年では、林産業界および建築業界においてこれら廃棄物の処理問題が大きな課題となっている。特に我が国では山地ではスギやヒノキ、ヒバ(ヒノキアスナロ)等、海岸林ではクロマツ等の針葉樹が多く植林されており、これらの国産資源の利用を促進する上からも、排出される廃材の利用法を開発する必要がある。

一方、樹木の抽出物は、有機化学的に興味深いため古くから研究されており、抗菌・抗害虫活性等を有しているものは、天然由来の農薬・医薬品として利用されてきた歴史がある。中でもテルペノイド類は、その構造自体が特殊で、合成の難しいものが多く、樹木から抽出して利用することがコスト的に望ましい。また、枝葉や端材のような廃材は構造材として利用することが難しいため、化学的利用を図ることが望ましい。特に国産のスギやヒノキ、クロマツの樹皮、針葉や心材部は多くのテルペノイドを含有しており、その抽出物を利用することは、上記の廃材の利用法として最も望ましいと考えられる。しかしながら、従来の抽出物の研究は活性成分の探索に焦点が置かれており、そのままでは生理活性を有していない大量にある成分についての利用に向けた研究は殆ど行われてこなかった。抽出成分利用では、たとえ強い活性のある成分を見いだしたとしてもその成分のみを抽出することは不可能で、その他の成分の利用も考えなければならない。スギを例にとると、抗菌活性などを有するフェルギノールや一部のセスキテルペンアルコールについての報告は多いが、心材または葉の主成分として大量に存在するその他のセスキテルペン類やジテルペン類などの活性や生体内外での反応の解析などは殆ど行われていない。そのため、これらの成分の存在意義についても不明であるのが現状である。

申請者らの研究では、そのままでは生理活性を示さない化合物でも自動酸化反応などによって活性化合物に容易に転換できることが明らかになっており、上記の成分も酸化反応に依って生体防御物質として機能する可能性が考えられ、半合成による抗菌、抗害虫剤として抽出物全体を利用することも可能となる。

また、特に自動酸化の反応性や生成物の活性評価を行うことは、新規反応の発見や、そ

の成分の樹木内での存在意義、すなわち、化学生態学的な成分の役割を知ることもつながる。そのため、多量に存在する未利用で生理活性不明の樹木成分の反応を調べ、これを明らかにすることは、未利用資源の利用開発による林産学、林産業界の発展のみならず、有機化学や森林化学、化学生態学の学問分野にとって有益である。

2. 研究の目的

本研究では、樹木成分として資源的に大量に存在する成分のうち、反応によって抗害虫、抗菌活性成分に転換できる成分を対象として、溶媒、触媒を極力用いず、化合物自体が持つ性質を利用した合成反応を検討する。申請者は、クロマツ心材および針葉抽出物の主成分であるロンギホレンとカリオフィレン、ヒバ材油主成分であるツヨブセンについての室温での自動酸化反応(1-10年間反応)を既に検討し、生成物の生理活性(抗シロアリ活性、抗菌活性)のデータを得ている。そこで本研究では、さらに研究を進展させるため以下の点を目的とした。

- ・ロンギホレン、カリオフィレン、ツヨブセンの自動酸化反応生成物の内、生理活性の見出されたものについて、熱反応によって反応を促進し、高い収率が得られる条件を検討と利用に向けた合成法の検討。

- ・未利用成分としてスギ、ヒノキ、クロマツ、ヒバ等の針葉や樹皮、心材の主成分である、セスキテルペン類(ヘディカリオール、 α -カジネン)とジテルペン類(カウレン、フィロクラデン、スクラレン、センブレン)の自動酸化反応、生物活性の検討。

3. 研究の方法

平成27年度は国産針葉樹廃材に含まれるセスキテルペン類の自動酸化反応生成物についての検討と、生理活性試験を行い、酸化反応が進んだ段階での生成物の単離や、抗菌試験(木材腐朽菌などのカビ類)、抗害虫試験(ヤマトシロアリ)等を行った。

平成28年度以降は、前年度の継続と他のセスキテルペン、ジテルペン類の自動酸化反応を解析し、その反応機構と生成物の抗菌、抗害虫活性等について検討した。また、特に反応機構が明らかになったロンギホレン等の反応で、活性を有する誘導体について、反応温度、時間、触媒等の反応条件を変化させて、特定成分が得られる条件を見出し、高収率合成法の検討を行った。

4. 研究成果

(1) カリオフィレン、フムレンの自動酸化反応

- ・カリオフィレン、 β -カリオフィレン(フムレン)の自動酸化反応を120℃で行った結果、対応するエポキシドの生成が初期から確認され、GC分析で生成物は、ほぼtrans-エポキシドのみが主になることが示された。

その後長時間の反応では cis-エポキシド、エポキシドが開裂したアルコールの生成が認められた。またカリオフィレンの室温の反応ではわずかな生成量であったエポキシド異性体 (cis-epoxide) の生成量が長時間の熱反応では増加することも示された。カリオフィレン、フムレンは室温放置でも単離後数日から1-2週間で60%程度の収率で対応するエポキシドを与えたが、熱反応では、GC 検出不能な重合物の生成も増加した。

(2) ロンギホレンの自動酸化反応

ロンギホレンの自動酸化についてこれまで明らかにしていた室温での反応とカリオフィレンの場合と同じく 120 °C での熱反応で生成物を比較した。熱反応では反応が促進され、短時間で室温の反応よりも生成物が高い収率で得られた。また、室温ではロンギカンフェニロールの生成が見られたが熱反応ではわずかであり、熱反応ではより酸化の段階が進んだロンギホレンヒドロキシケトンの生成が見られた。また、ロンギホレンヒドロキシケトンの立体構造も決定した。得られた生成物の構造を図1に示す。

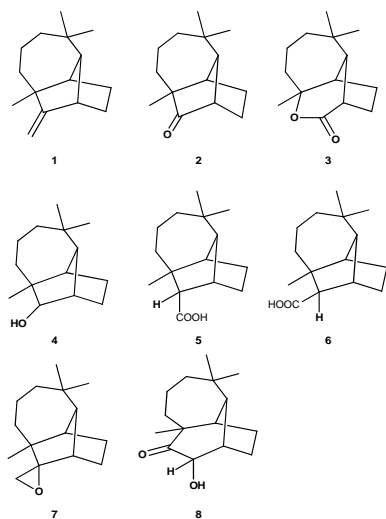


図1 ロンギホレンの自動酸化生成物

1 ロンギホレン; 2 ロンギカンフェニロン; 3 ノルロンギラクトン; 4 ロンギカンフェニロール; 5 ロンギホレン酸; 6 イソロンギホレン酸; 7 ロンギホレンオキシド; 8 ロンギホレンヒドロキシケトン

GC-MS による反応の追跡から、反応の初期過程でエポキシド構造を有するロンギホレンオキシドの生成が確認でき、その後その他の成分が生成していることが明らかとなった。そのため、このエポキシドをメタクロロ過安息香酸 (mCPBA) とロンギホレンのベンゼン溶媒中での反応から合成した。このエポキシドを加熱したところ、ロンギホレンの熱反応で見られた成分が生成したためエポキシドを中間体とする反応機構が明らかとなった (図2)。

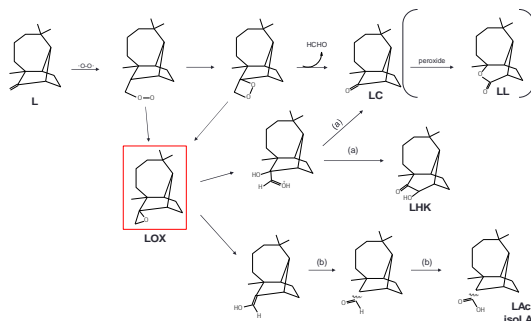


図2 ロンギホレンの自動酸化反応のロンギホレンオキシドを中間体とする予想反応機構

(3) ツヨブセンの自動酸化反応

ツヨブセンの反応については長濱ら (1987) によって過酸化物二量体を中間体とする自動酸化反応機構が提唱されている。ロンギホレンと同様に加熱によって反応が促進されるかどうか検討した。120 °C 空气中でツヨブセンを加熱攪拌すると、短時間で固体化し、反応を続けることができなかつた。そのため、より低温の 100 °C 空气中で攪拌を行った。その結果、室温での反応生成物であるマユロン、エポキシツヨブサノール、イソツヨブサノン、ツヨブサジエンの生成が室温の反応よりも短時間で確認された。100 °C での反応と室温での反応を比較すると、マユロン、ツヨブサジエンは室温での反応のほうが比較的多く生成し、エポキシツヨブサノール、イソツヨブサノンは 100 °C での反応のほうが多く生成することがわかつた。また、反応中間体となる過酸化物をヨウ素滴定を用いて反応の時間ごとに追跡した結果、加熱反応では反応初期に増加した後、時間とともに減少することが確認された。また過酸化物は室温での反応の方が多く残存しており、加熱によって過酸化物の生成と分解が促進されることも示された。しかしながら加熱反応でのマユロン等の収率が低いことから、加熱による過酸化物の分解とその過程で生じたラジカルの再重合反応も起きていると考えられ、この再重合反応を抑制する必要があることも課題として示された。

(4) ヘディカリオール反応

ヘディカリオールは単離して室温放置すると短時間で容易にユーデスマール類とエレモールに異性化した。これはよく知られた反応であるが、酸化よりも異性化反応が優先することが示されたため、成分利用においては、ユーデスマール類とエレモールについての生物活性を検討する必要があることが示された。ユーデスマール類とエレモールは、スギ針葉抽出物から単離可能であるため、生物活性はスギ針葉成分の活性評価の研究と合わせて行った。これらについてはすでに抗菌、抗蟻活性は知られているため、外来種で繁殖の抑制が望まれているニセアカシア種

子に対するアレロパシー活性試験（種子発芽、生長抑制試験）を行ったところ、両化合物に活性が見られ、新たな知見を見出すことができた。

(5) カジネンの酸化反応

単離後、暗所に保管されていたサンプルのGC-MS分析を行った。その結果多くの酸化物が確認でき、まずスペクトルから、芳香環化した成分であるカラメレン、カダレン、やケトンと水酸基を有する複数のオキシアルコールが生成することが示された。反応生成物は複雑であり、多様な生成物が生じることが明らかとなった。また、脱水素反応による芳香環化が進むことからカジナン形の構造では、酸素付加とその後の脱水/脱水素反応によって2重結合の共役が進み、最終的に芳香環化まで至ることが示された。これは成田（2006）によって提唱されているスギ埋れ木の心材成分の経年変化機構と一致している。したがって本研究で、これまで推測であった自然状態で放置された木材中の成分の変化を、実際の成分を用いて実験的に確認することができた。またカジネンや最終酸化物に至る中間体と考えられるカジノール類やその他の酸化物について単離を行った。これらの抗菌、抗蟻活性は知られているため、湖沼で抑制が望まれている有害藻類に対するアレロパシー活性（成長抑制試験）を行ったところ、カジノール類やその他単離物に活性があることが示され、スギ心材抽出物の新たな生物活性を見出すことができた。

(6) ジテルペン類の酸化反応

カウレン等のジテルペン炭化水素について反応を試みた。一例として、明確に生成物が確認できたクロマツ心材成分のセンブレンの反応について示す。センブレンを空气中100、120で攪拌し、生成物のGC-MS分析を行った。その結果、センブレンの分子量+16のモノオキサイド、+32のジオキサイド及びそれらの開裂したアルコールが100、120の反応で複数生成することが示唆された。しかしながら、反応開始後、比較的短時間（2-4時間）で反応物は固化・重合した。また、生成物は複雑であり、GC検出不能な成分の生成が多いことが単離過程で明らかとなった。センブレン等の反応では反応中に容易に重合し、固体化が起こる傾向があった。本研究では溶媒の使用等なく反応を行ったが、重合しやすい成分の場合は、ごく少量の溶媒の使用を検討するなど、重合の抑制について工夫する必要があることや、重合物の解析を行う必要があること明らかとなり、次の研究段階に向けた今後の課題が示すことができた。

(7) 生成物の生物活性(抗蟻活性, 抗菌活性)の検討

各自働酸化生成物の生物活性について、ヤマトシロアリを対象とした抗蟻活性、木材腐

朽菌を主な対象とした抗菌活性試験を行って評価した。特にロンギホレンとツヨプセンの自動酸化生成物の生物活性について以前の研究から進展した新たな知見を得た。ロンギホレンとツヨプセンの自動酸化生成物の生物活性評価について以下に示す。

原料のロンギホレンは殺蟻活性・摂食阻害活性を示さず、抗菌活性もほとんど示さなかったが、自動酸化生成物は原料よりも強い抗蟻・抗菌活性を示した。特に加熱反応で多く生成したロンギホレンヒドロキシケトンが最も強い殺蟻活性を示した。一例として、図3に抗蟻活性試験の結果を示す。

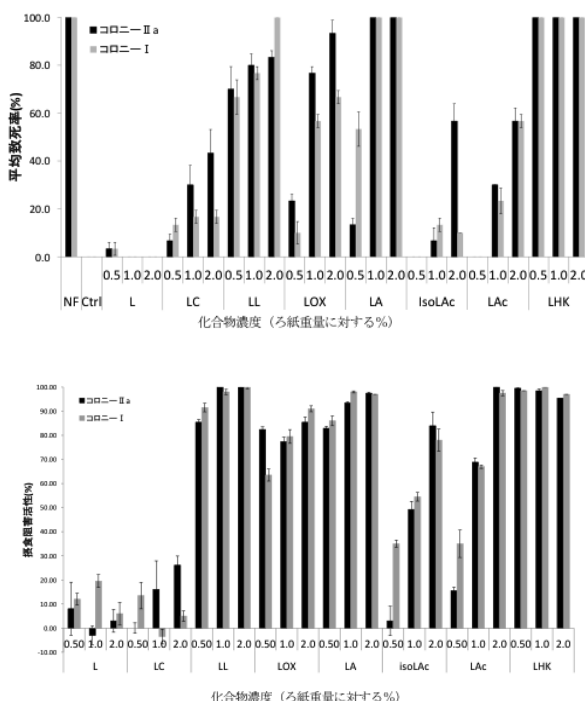


図3 ロンギホレン及びその自動酸化生成物のヤマトシロアリに対する殺蟻活性(上)と摂食阻害活性(下)

注: ヤマトシロアリは異なる2つのコロニー(コロニーIおよびIIa)から採取して各々試験した。NF 無給試験; Ctrl; コントロール; L ロンギホレン; LC ロンギカンフェニロン; LL ノルロンギラクトン; LOX ロンギホレンオキサイド; LA ロンギカンフェニロール; IsoLAc イソロンギホレン酸; LAc ロンギホレン酸; LHK ロンギホレンヒドロキシケトン

この強い抗蟻活性を有するロンギホレンヒドロキシケトンの生成は加熱反応で生じることが明らかとなったが、クロロホルム中でのmCPBAとロンギホレンの反応によって高収率で合成できることが示された。したがって当初の目的である生物活性物質の抗収率合成法を示すことができた。抗菌活性ではロンギホレン酸類が強い活性を示した。ツヨプセンも抗蟻・抗菌活性は示さなかったが、自動酸化生成物のマユロン、エポキシツヨ

ブサノールが殺蟻活性および摂食阻害活性を示した。ツヨブセンの自動酸化生成物は、抗菌活性試験ではロンギホレンの自動酸化物に比べると弱い活性であったが、マクロンはカワラタケに対して一定の抗菌活性を示した。一方、当初強い活性を有すると思われた過酸化二量体について、単離して活性評価を行ったところ抗蟻、抗菌活性ともに弱い活性であった。したがって、ツヨブセンの自動酸化反応で強い生物活性物質を得るためには、中間体となる過酸化物の分解反応を促進させることが重要となることが示された。しかし、分解物の重合も上記のように予想されるため、重合反応の抑制についても検討が必要である。この重合反応の抑制はゲルペン類でも同様であり、新たな研究課題が本研究で示された。

引用文献

Shizuo Nagahama, Masato Tazaki, Terpenoides. X natural autoxidation of thujopsene. Bull Chem Soc Jpn 60, 1987, pp.4453-4454

成田廣枝, 埋木の特性-有機地球素材への展望-, 八十一出版, 2006, pp.27-38

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

(1) Yuri Suzuki, Hiromi Saijo, Koetsu Takahashi, Hisayoshi Kofujita, Tatsuya Ashitani, Growth-inhibitory components in Sugi (*Cryptomeria japonica*) extracts active against *Microcystis aeruginosa*, Cogent Environmental Science, 2018, doi.org/10.1080/23311843.2018.1466401 査読あり

(2) Akisato Mukai, Koetsu Takahashi, Tatsuya Ashitani, Antifungal activity of longifolene and its autoxidation products. European Journal of Wood and Wood Products, 76(3), 2018, pp. 1079-1082 査読あり
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00107-017-1281-9>

(3) Akisato Mukai, Koetsu Takahashi, Tatsuya Ashitani, Natural autoxidation of longifolene and anti-termite activities of the products. Journal of Wood Science, 63(4), 2017, pp. 360-368 査読あり
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10086-017-1637-0>

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 向井堯徳, 高橋孝悦, 芦谷竜矢 (2018): Thujopsene の過熱による自動酸化生成物の抗菌活性, 第 68 回日本木材学会大会, M15-P-06

(2) Tatsuhiko Yokosuka, Shunya Tanaka, Koetsu Takahashi, Tatsuya Ashitani: Inhibition activity of components in Japanese conifer against invasive plant species, The joint meeting of 33rd annual meeting of the ISCE and the 9th meeting of APACE, 2017, Kyoto

(3) 向井堯徳, 高橋孝悦, 芦谷竜矢 (2017), Thujopsene の加熱による自動酸化生成物の抗蟻活性, 第 67 回日本木材学会大会, M18-P1-05

(4) 向井堯徳, 高橋孝悦, 芦谷竜矢 (2016): Thujopsene の自動酸化反応, 第 66 回日本木材学会大会, M28P06

(5) Akisato Mukai, Tatsuya Ashitani, Koetsu Takahashi, Autoxidation of longifolene and antitermite activity of its products, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), 2015, Hawaii, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦谷竜矢 (ASHITANI, Tatsuya)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 20423486