

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14717

研究課題名(和文)『トマトの生きる知恵』の生物有機化学的解明

研究課題名(英文)Evaluation of the knowledge how tomatoes stand for environmental stress

研究代表者

松浦 英幸 (Matsuura, Hideyuki)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20344492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は研究期間内に、下記の2点を明らかにすることを目的とした。1】トマト果実内に存在する胎生発芽抑制物質の化学構造とその生理機能を明らかとする。2】トマトの原種、*Solanum pennellii*の植物体を覆う、粘性物質の化学構造および展着剤としての可能性を明らかとする。項目1に関しては、種子を含む口キールの抽出物に発芽抑制活性は確認できたものの、活性物質の単離、同定には至らなかった。項目2に関しては、粘性物質の本体であるacylglycerolの単離精製方法を考案し、その化学構造を明らかとすることができた。また、その粘性を利用した農業資材の利用法に関して言及できた。

研究成果の概要(英文)：Tomato is one of the most common food in the world, and it produces many nutrition sugars, and chemicals such as carotenoids, alkaloids, flavonoids and oxylipins. In this study, it was planned that isolation and structural determination of inhibitor(s) of viviparous germination and acyl sugars on the surface of plant body on tomato plant. We attempted the isolation of the inhibitor from gels containing tomato seed. The inhibitory activity was observed using the EtOH extract of gels, although isolation and structural determination of the inhibitor was not accomplished. The acyl sugars were known as important ingredients for plants to survive, although the efficient isolation method had not been established. In this study, the methodology was designed and two acyl glucose were isolated from *Solanum pennellii*. Their chemical structures were determined as 2,3,4-triisobutyl- $\alpha$ -D-glucose and 2-(2-methylbutyl)-3,4-diisobutanoyl- $\alpha$ -D-glucose.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然生理活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

植物の傷害応答機構、重力識別、日長感知、パレイショ塊茎の休眠機構など、依然としてその作用機序が明らかとされていない生物現象が数多ある。一見するとこれらの生物現象は我々の実生活からは離れたものと感じがちであるが、『トマトを食する時に、果実内で発芽した種子にお目にかかった事がない』等の事例は不思議に思わないかもしれないが、その作用機序が明らかとされていない生物現象であり、我々の普段接している事項でもある。

## 2. 研究の目的

本課題では身近故に見落としがちな植物の生きる知恵を探り、得られた知見の応用展開を試みるものである。身近な素材として本課題ではトマトを扱い、その題材として、(1) トマト果実内胎生発芽抑制物質および、(2) 植物体表面を覆う粘着物質について生物有機化学的知見より明らかとする。

## 3. 研究の方法

## (1) トマト果実内胎生発芽抑制物質

トマト種子を包むゲル (ロキュール) 内に阻害物質が蓄積している事を明らかとしている。また、ゲル内の ABA 濃度はほぼ 0.8 M である事も明らかとしているが、この濃度の ABA を発芽阻害試験に供しても、発芽阻害が観察されない事が解っている。また、ゲル抽出物をアルコール沈殿法により、沈殿部、上澄部に分離した場合、その阻害活性が上澄部に存在する事を明らかとしている。これらの先行データを踏まえ、以下の方法で実験を行う。実験材料として市販のトマト果実を用い、ゲル抽出物をアルコール沈殿に供し活性を示す上澄部を得る。これを用いて活性化合物の単離を試みる。化合物精製の一般的資材には Diaion HP-20、シリカゲル、セファデックス LH-20 等の担体を用いる。活性化合物の分離の指標となる生物検定はトマト種子を用いた発芽阻害試験を用いる。単離精製された化合物については NMR 等、種々の機器分析データをもとにその化学構造を決定する。

## (2) 植物体表面を覆う粘着物質

*S. pennellii* を温室にて栽培し、実験材料として用いる。目的化合物は葉部をエタノールに 10 分程度浸す事で、ほぼ単離精製が可能である事が明らかとなっている。しかし、粘性物質の本体は acyl glucose であることが予想された。Acyl glucose は一般に  $\alpha$ 、 $\beta$  体の平行混合物であることが知られ、単離精製、詳細な構造決定に困難をきつことが知られていた。そこで、単離精製する際に誘導体化す

ることでこの問題を解決しようとした。精製方法はほぼ確立されているので、可能な限り多くの化合物量を確保し、種々の機器分析データをもとにその化学構造を決定する。また、粘性物質である特徴を生かし、農業資材としての応用を試みる。

## 4. 研究成果

## (1) トマト果実内胎生発芽抑制物質

トマト種子を包むゲル (ロキュール) 内に阻害物質が蓄積している事を明らかとしていたが、精製を進める過程で活性が消失し、活性化合物の単離精製には至らなかった。市販のトマト、20 kg を用いて実験を行ったが、単離精製構造決定のためには、さらに実験材料を増量して抽出材料として用いるべきと思われる。

## (2) 植物体表面を覆う粘着物質

## ① Acyl glucose の誘導体化の検討

Acyl glucose を単離精製するために誘導体化を試み、誘導体化にはベンジル化を採用した。植物体を 10 秒ほど有機溶媒に浸すことで、acylglucose を含む抽出液を取得後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供することで acylglucose を含む画分を回収した。得られた acylglucose を含む画分を用いて、種々のベンジル化条件の検討を行った。NaH, benzylchloride/THF および MgO, DBT-BM/DME の条件では複雑の混合物を与えた。一方、Acyl glucose を 1,4-ジオキササンに溶解し、Tri-BOT, TfOH を加え、室温で一晩反応したところ、原料のスポットは消失し、低極性側に新たなスポットが二つ確認できた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC により分画を行い、二種の誘導体を単離した。

## ② ベンジル化 acylglucose (BenAG) の構造決定

上記の方法により単離した 2 種のベンジル誘導体を BenAG (1), (2) とした。BenAG1 は  $[\alpha]_D^{26} = -2831.8$  の無色油状物質として単離された。HRFD-MS では親イオン  $[M]^+$  が  $m/z$  570.28225 に観測され、化合物の化学式は  $C_{32}H_{42}O_9$  (計算値  $m/z$  570.28288) と推定された。 $^1H$  NMR、 $^{13}C$ /DEPT NMR により、化合物 1 はグルコース骨格を有し、 $[\delta_H$  3.58 (ddd,  $J_{HH}=4.5, 10$ ), 4.52 (d,  $J_{HH}=10$ ), 4.8 (d,  $J_{HH}=10$ ), 4.99 (dd,  $J_{HH}=11, 11$ ), 5.06 (dd,  $J_{HH}=10, 11$ ), 5.13 (dd,  $J_{HH}=11, 11$ ), 5.16 (d,  $J_{HH}=10$ )] 2 つのベンジル基 [ $\delta_H$  7.17-7.25 (m)] と、3 つの分枝エステル [ $\delta_C$  175.3 (C), 175.4 (C), 176.2 (C), 33.9 (CH), 33.9 (CH), 33.9 (CH)] が存在することが判明した。詳細な構造を決定するため、各種 2 次元 NMR を測定した。NOESY スペクトルの解析を行った。H-1、H-3、H-5 の NOE 相関によりグルコース骨格は  $\beta$  構造であることが判明した。 $^1H$  NMR においても

H-1 のカップリングが  $J_{\text{H}}=10, 10$  (dd) であることから、グルコースが  $\beta$  構造であることが裏付けられた。HSQC スペクトルの解析により、H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.16 d,  $J_{\text{H}}=10$ ) がアノメリックプロトンであることが判明し、COSY スペクトルにより、2 位から 6 位のプロトンをそれぞれ決定した。HMBC、COSY スペクトルの解析を行った。H-1 から C-1', H-2 から C-A1、H-3 から C-B1、H-4 から C-C1、H-6 から C-1'' への HMBC シグナルの相関、さらに H-1'' から H-3''/H-7''、H-1'' から H-3''/H-7'' の COSY 交差ピークにより、ベンジル基はそれぞれグルコース骨格の 1 位、6 位に導入されており、また 3 つの分枝エステルはそれぞれ 2 位、3 位、4 位に結合していることが判明した。HMBC の H-A2 から C-A1、H-B2 から C-B1、H-C2 から C-C1 へのシグナルにより、それぞれのエステルの分枝位置はカルボキシル基に隣接していることが判明し、さらに、COSY の H-A2 と H-A3/H-A4、H-B2 と H-B3/H-B4、H-C2 と H-C3/H-C4 の交差ピークにより、それぞれの分枝位置の炭素には 2 つの末端メチルが結合していることが判明した。以上の結果から化合物 1 は  $\beta$ -D-グルコースの 1, 6 位にベンジル基、2, 3, 4 位にイソ酪酸がエステル結合した化合物であると決定づけた(図 1)。

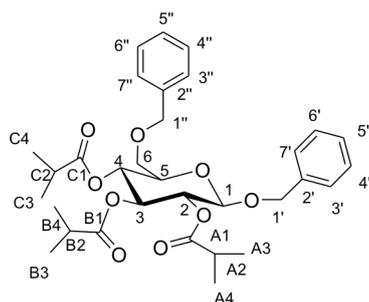


図 1. BenAG(1)の化学構造

化合物 2 は  $[\alpha]_{\text{D}}^{26}=-1378.23$  の黄色油状物質として単離された。HRFD-MS では親イオン  $[M]^+$ 、 $m/z$  584.29713 に観測され、化合物の化学式は  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_9$  (計算値  $m/z$  584.29835) と推定された。 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR を解析したところ、シグナルは化合物 1 と酷似しているが、いくつか異なったシグナルが得られた。2H 分の非等価プロトン [ $\delta_{\text{H}}$  1.27 (ddq,  $J_{\text{H}}=7.5, 15, 7.5$ ), 1.52 (ddq,  $J_{\text{H}}=7.5, 16, 7.5$ )] と、3H 分の末端メチル ( $\delta_{\text{H}}$  0.75, dd  $J_{\text{H}}=7.5, 7.5$ ) である。HSQC (Chart 21) 解析により、2H 分の非等価プロトンは同じ炭素に結合しており、さらに COSY スペクトル解析により、H-A3' から H-A4' のシグナルにより、末端メチルは非等価プロトンのメチレンに結合していることが分かった。NOESY スペクトルより炭素骨格は  $\beta$ -D-glucose 骨格を有することが判明し、HMBC スペクトル解析により、H-2 から C-A1 のシグナルは、2-methylbutyryl 基がグルコー

ス骨格の二位に結合していることを示唆した。つまり、化合物 2 の構造は、1, 6-dibenzyl-2-(2-methylbutyryl)-3, 4-diisobutyryl- $\beta$ -D-glucose であると決定した(図 2)。

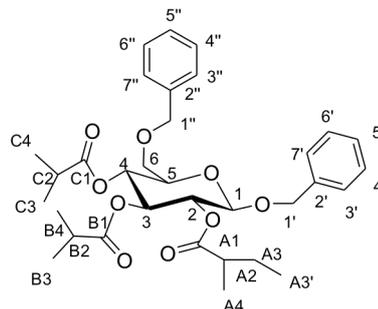


図 1. BenAG(2)の化学構造

### ③脱ベンジル化による天然体 acylglucose (3, 4) の単離・構造決定

化合物 1, 2 をそれぞれメタノール溶液とし、パラジウム/カーボンを触媒として用いて水素雰囲気下で脱ベンジル化を行った。TLC で確認したところ、天然体の acylglucose と同一の挙動を示すスポットの出現が確認された。目的のスポットを含む画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより回収した。その結果、化合物 1 から AG1 (3) を、化合物 2 から AG1 (4) をそれぞれ 43%、91% の収率で得ることに成功した。化合物 3 は  $[\alpha]_{\text{D}}^{27}=55.7$  の無色油状物質として単離された。HRFD-MS から親イオン  $m/z$  391 ( $[M+H]^+$ )、FD-HI-MS から分子式  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_9$  ( $m/z$  391.19825  $[M+H]^+$  (計算値 391.19681)) と判明した。 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR のスペクトルデータにより、ベンジル基が化合物 1 から取り除かれたこと、さらに acylglucose がアノマー化していることが判明した。各種二次元 NMR を測定し、構造決定を試みたが、アノマー化により構造決定は困難を極めた。しかし、特徴的  $^1\text{H}$  NMR のシグナルである 3H 分の分枝位置のプロトン、18H 分の末端メチルが観測されたこと、分子式が  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_9$  であること、TLC で天然の acylglucose と同一の挙動を示したことを考慮し、脱ベンジル化により得られたのは天然体の acylglucose である 2, 3, 4-triisobutyryl-D-glucose (3) であると決定づけた。

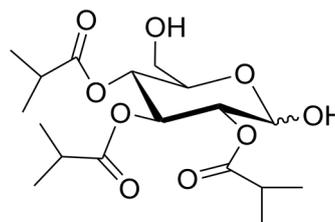


図 3. AG1 (3)の化学構造

化合物 **4** は  $[\alpha]_D^{27} = 55.8$  の無色油状物質として単離された。ToF-MS から親イオン  $m/z$  405  $[M+H]^+$  に観測され、HRTof-MS より、分子式  $C_{19}H_{32}O_9$  ( $m/z$  405.2109  $[M+H]^+$  (計算値 405.2125) と判明した。 $^1H$  NMR、 $^{13}C$  NMR スペクトルデータにより、ベンジル基が化合物 **2** から取り除かれ、acylglucose はアノマー化していることが判明した。特徴的な  $^1H$  NMR シグナルである 2H 分の非等価プロトン、さらに AG1 (**3**) にはない 3H 分の末端メチルのシグナルが観測されたこと、分子式が  $C_{19}H_{32}O_9$  であること、TLC で天然の acylglucose と同一の挙動を示したことを考慮し、脱ベンジル化により得られたのは天然体の acylglucose で 2-(2-methylbutyryl)-3,4-diisobutyryl-D-glucose (**4**) であると決定づけた。

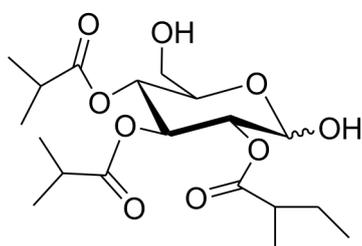


図 4. AG1 (**4**) の化学構造

#### ④ Acylglucose を含む *S. pennellii* 葉部溶出液を用いた乾燥耐性付与試験

短日条件下でシロイヌナズナを 1 ヶ月半育成し、新しいトレーに移し替え、水を与えずに acylglucose のクルードの EtOH 溶液を、0.5 mg/ml 水溶液となるように調整したものを 2 週間、1 日おきに滴る程度に霧吹きで吹きかけた。二週間後、コントロールはすべて枯れたが、acylglucose 処理のシロイヌナズナには個体差はあるものの、比較的乾燥による萎凋が抑えられている株が多く見受けられた(図 5)。したがって、acylglucose は乾燥耐性に寄与していると判断できる。



図 5. Acylglucose の乾燥耐性付与活性  
上段は Mock 処理、下段は acylglucose のクルード EtOH 溶液を含む水溶液 (0.5 mg/ml) を噴霧。

#### ⑤ Acylglucose を含む *S. pennellii* 葉部溶出液を用いた昆虫補足試験

中試験管を acylglucose クルードのエタノール溶液 (0.5 g/ml) に浸し風乾した後、支柱

の上に置き、4 週間温室内で、周りに植物がない状態、激しく虫害を受けている大根のそばに放置し、それぞれ 1 週間ごとに付着している虫の数を数えた。この結果、Mock 処理においては補足される昆虫はいなかったが、処理区では捕獲される虫の数は一度も減ることなく増え続けた。つまり、acylglucose はその持続性のある粘着力により、小さな虫、害虫をとらえ、保持し続けることにより、害虫耐性を得ていると判断できる。

#### ⑥ Acylglucose のアレロパシー活性

単離した AG1 (**3**)、AG2 (**4**) をそれぞれ 100 M、50 M となるように加えた MS 培地にシロイヌナズナ (A) の種子を播種した。播種後、検定培地上で 11 日育成させたのち、根の長さを測定し、根伸長阻害活性を評価した。Welch の t 検定により有意差を検定したところ、AG2 (**4**) にのみ有意差が 1% の危険率で根伸長阻害活性が確認された。

以上の実験により、単一の化合物としての単離、機器分析データの提供がなかった acylglucose (**3**, **4**) の構造決定を達成した。また、単一の化合物によるアレロパシー活性や、混合物ではあるが乾燥耐性付与活性、昆虫捕捉活性を明らかにすることができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

原種トマト *Solanum pennellii* の表皮分泌物 Acylsugar の単離、構造決定法の開発とその応用的利用法、南部百合香、井上悠敬、高橋公咲、松浦英幸、日本農芸化学会北海道支部会 (北海道大学農学部、札幌、11/23)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松浦 英幸 (Matsuura Hideyuki)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：11135714