

平成21年05月10日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780083
 研究課題名（和文） 高等植物に着生するチャワнтаケ類の収集とそれらを用いた新生理活性物質の探索研究
 研究課題名（英文） A Search for New Bioactive Compounds Produced by Ascomycete
 研究代表者
 塩野 義人（SHIONO YOSHIHITO）
 山形大学・農学部・准教授
 研究者番号：80361278

研究成果の概要：未利用な微生物資源の一つに位置付けられる盤菌類（チャワнтаケ類）に含まれる生理活性物質を探索した。ツバキ花腐菌核病を誘発する病原菌の完全世代であるツバキキンカクチャワнтаケより、植物生長阻害活性物質としてアガリチック酸のモノメチルエステル体を明らかにした。ブナの殻斗に小さな子囊盤を形成するシロヒナノチャワнтаケより、抗菌活性物質としてノルコーレンソイック酸を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：天然物化学

1. 研究開始当初の背景

天然物には、人の考えが及ばぬ化学構造や生物活性を示すものがあり、これまでも植物や微生物、海洋生物、昆虫類といった様々な生物から、数多くの有用物質が発見されている。しかし、この数十年間で、天然物の探索研究は熾烈を極め、すでに取り尽くされ、基本骨格は出そろったとも言われ、天然資源からのスクリーニング研究が減少している。こうした中、大手の企業では合成コンビケムライブラリーをソースに用いた創薬研究にシフトし、多数の候補

物質の合成やハイスループットスクリーニングによる探索研究がなされている。しかし、合成ライブラリーの基となる基本骨格が少ないことから、期待される程の成果は上がっていない。そのため、天然資源からの新しい創薬のリード化合物の探索に再び注目され始めている。

2. 研究の目的

盤菌類は子囊菌類に属し、非土壌生で子囊盤と呼ばれる子実体を腐朽植物に形成する。一般に、子囊盤は1 cm 以下の小型である

ことが多く、人目につきやすい大型の子実体を形成する担子菌類（キノコ）とは異なり、非食で、採集されることは稀である。また、通常の土壌分離菌類を用いたスクリーニングにおいては、盤菌類が釣菌されないため、これまでに戦略的な生理活性物質のスクリーニング源として用いられることも少なかった。さらに、盤菌類は特定の植物と密接に関連して生息していることが多く、その生活環も興味深い。このようにほとんど研究されてこなかった盤菌類は、天然物有機化学の分野から見ても、魅力的な微生物資源であるため、我々のグループでは、盤菌類を対象に有用な生理活性物質を探索している。本研究では、盤菌類のうち比較的採集が容易な次の菌類に着目し、それぞれに含まれる特徴的な生理活性物質について調査した。

3. 研究の方法

(1) ツバキキンカクチャワಂತケ

ツバキキンカクチャワಂತケはツバキ花腐菌核病を誘発する病原菌の完全世代である。本病に感染した花は、花腐れを生じて落下し、罹病花に菌核が形成される。越冬後、ツバキの開花時期に合わせ、地表上に堆積する昨年の落下した花から、子囊盤が形成される。続いて、子囊盤より空中に放出された胞子は、花卉や花粉に付着し、発芽・繁殖し、やがてツバキ花腐菌核病を引き起こすという伝染環を繰り返す。花腐病の最大の防除対策は、子囊盤形成や花への感染経路の一部を遮断し、伝染鎖を断ち切ることである。現在、防除対策の一つに抗菌剤が多用されているが、耐性菌の出現により、他の防除法が望まれている。このようにツバキキンカクチャワಂತケは、ツバキにのみ花腐菌核病を引き起こす生活環が提示されている特異な菌類であるにもかかわらず、感染防御に関わる天然物質の探索研究は行われていない。そこで、花腐菌核病防除や感染成立の機構解明の基礎研究として、ツバキキンカクチャワಂತケやその培

養菌糸体より生産される特徴的な物質を探索した。



ツバキキンカクチャワಂತケの写真

(2) 採取

平成 19 年と平成 20 年の 5 月初旬にツバキキンカクチャワಂತケ（新鮮重量：30 g）を採取した。それらをアセトンにより抽出し、アセトン抽出物を得た。アセトン抽出物はレタス幼根に対する生長阻害活性試験により、阻害活性を示したため、この阻害活性を指標に活性物質を単離することにした。

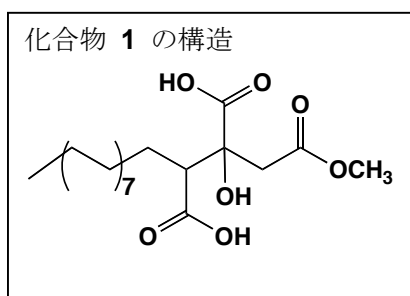
(3) 化合物 1 の単離

得られたアセトン抽出物について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル）にて精製し、11 のフラクション（Fr. 1-1~1-11）を得た。さらに、Fr. 1-5 と Fr. 1-6 についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィーにより精製し、活性物質（1：12 mg）を単離した(Fig. 1)。

(4) 化合物 1 の構造

化合物 1 の IR スペクトルより、エステルに帰属される吸収が 1710 cm^{-1} に観測された。化合物 1 の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 100MHz) より、18-20 本の炭素が観測されたことと ^1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400MHz) おける多数の重なったメチレンシグナルのプロトン数、質量分析の結果を併せ、1 の分子式を $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_7$ と決定した。 ^{13}C NMR スペクトルより、3 本のエステル、それぞれ 1 本のメトキシ基 (δ 52.1)、 sp^3 の四級炭素 (δ 76.9)、メチル基 (δ 14.5)、メチン (42.5)、さらに 16 個のメチレンに帰属

される重なった 6 本 (δ 23.7, 28.1, 28.8, 30.5, 30.8, 33.1) のシグナルが確認された。一方、 ^1H NMR スペクトルにおいて、1 本のトリプレットメチル基 [δ 0.89 (1H, d, $J = 7.4$ Hz)]、メチン [δ 2.65 (1H, d, $J = 9.0$ Hz)]、多数の重なったメチレン (δ 1.27)、孤立したメチレンシグナル [δ 2.72 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), 3.10 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)] が観測された。次に、それぞれの部分構造を各種二次元 NMR 実験より得られる相関より結合させた。その結果、**1** の平面構造が明らかになった。この平面構造をもとに文献検索を行ったところ、アガリチック酸 (agaricic acid) のモノメチルエステル体であることが判明した。



(5) レタス幼根に対する生長阻害活性試験

化合物 **1** のレタス幼根に対する生長阻害活性試験を行った。その結果、200 ppm で 50 % の生長阻害活性を示した。本活性は、市販の植物生育阻害剤 (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) の活性と比較すると、200 倍以上弱く、また、天然物との比較においては、本研究室でアレロパシー物質として単離されたジテルペンのジョドレリン T や植物ホルモンのアブシジン酸よりも 30 から 100 倍程度弱いものであった。

(6) シロヒナノチャワンタケ

シロヒナノチャワンタケは、落下したブナの果実の殻 (殻斗) に、0.5 cm にも満たない非常に小さな子囊盤を形成する盤菌類である。本菌の生活環は、春に子囊盤から

放出された胞子がブナの樹皮や葉に付着し、発芽し、落果前の樹上の殻斗内に感染する。落果後、越冬し、地表に堆積した殻斗に子囊盤を形成すると考えられている。このようにシロヒナノチャワンタケは既に菌糸体として、樹上の殻斗内に感染していることから、シロヒナノチャワンタケとブナやブナ林との関わりや役割についても興味を持たれているものの、本菌の実際の役割は明らかになっていない。一方、落下したブナ殻斗は、じめじめした地面に堆積し、様々な微生物の生育場所になっていると予想されるが、そこには本菌が優先して子実体を形成している。それには、おそらく、本菌の他の微生物に対する抗菌活性作用の関与が考えられる。そこで、本菌の子実体や培養菌糸体から抗菌作用物質を探索し、その物質の構造を明らかにした。



シロヒナノチャワンタケの写真

(7) 採取

平成 19 年と平成 20 年の 5 月中旬に山形県の月山麓のブナ林でシロヒナノチャワンタケを採取した。100 個以上の殻斗を採取し、シロヒナノチャワンタケを採取したが、十分な量を得ることが出来なかったため、シロヒナノチャワンタケの菌糸培養物に活性を示す物質を探索ことにした。

(8) シロヒナノチャワンタケの胞子発芽実験

子囊胞子を射出する盤菌類の特性を利用し、純粋培養を試みた。実験に先立ち、滅菌したプラスチックシャーレに素寒天を固めて用意しておく。(素寒天にはクロラムフェニコールを 100 mg/l 添加しておく)。次に、平板シャーレの寒天の中央部より、3~

5 mm の寒天片を切り出し、シャーレの蓋の裏側の中央と縁の中程あたりに、その寒天片を付着させる。次に、盤菌類の子囊盤の柄を寒天片中に、子囊盤の子実層が下に向くように差し込んだ。胞子は、寒天に向けて下の方に放出される。数時間後、射出胞子からの発芽を観測し、その菌糸をスラントに植え継いだ。このようにして得られた菌糸を用いて、液体培養に用いた。

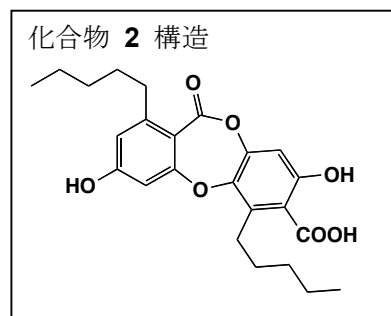
(9) シロヒナノチャワンタケ菌糸の培養と化合物 2 の単離

シロヒナノチャワンタケの培養物 (300 ml) [培養条件; 麦芽エキス培地 (麦芽エキス: 4%, グルコース: 4%, ペプトン: 1.0%, 条件: 21 日間、25 度で振盪培養)] をろ過し、母液を等量の酢酸エチルで抽出した。得られた抽出物について、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 (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル) にて精製し、11 のフラクション (Fr. 1-1~1-11) を得た。さらに、Fr. 1-6 と Fr. 1-7 についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物 2 (15.0 mg) を得た。

(10) 化合物 2 の構造

化合物 2 は高分解能質量分析により、分子式 $C_{24}H_{28}O_7$ と決定した。化合物 2 の ^{13}C NMR スペクトル (CD_3OD , 100MHz) より、2 本のエステル (δ 164.9, 173.5)、12 本の二重結合 (δ 106.3, 107.7, 113.1, 113.2, 116.5, 139.7, 143.3, 149.8, 151.8, 160.6, 163.9, 164.7)、8 本のメチレン (δ 23.7, 29.3, 32.3, 32.7, 33.1, 33.9, 35.2)、2 本のメチル基 (δ 14.8, 14.9) に帰属されるシグナルが確認された。一方、 1H NMR スペクトル (CD_3OD , 400MHz) において、4 置換と 5 置換ベンゼン [δ 6.51 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.54 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 6.55 (1H, s)], カップリングしたメチレン側鎖 [δ 1.19-1.56 (12H, m), 2.68 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.10 (2H, t, $J = 8.0$ Hz)], トリプレットメチル基が観測された。次に各種二

次元 NMR 実験より得られる相関より結合させた結果、2 の構造を既知のノルコーレンソイック酸 (norcolensoic acid) と同定した。また、ノルコーレンソイック酸はシロヒナノチャワンタケの子実体にも含まれていることを NMR 計測から明らかにした。



(11) 生理活性試験

抗菌活性試験: 被検菌には、*Aspergillus clavatus* F318a, *Candida albicans* ATCC 2019, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Epicoccum nigrum*, *Phomopsis* sp. KS-37, *Fusarium* sp. YG-45, *Xylaria* sp. YUA-026 を用い、評価は阻止円で判定した。その結果、*Epicoccum nigrum* (阻止円: 13 mm, 9 μ g/disk) と *Staphylococcus aureus* (阻止円: 0.9 mm, 9 μ g/disk) に対して、顕著な生育活性を示した。レタス幼根に対する生長阻害活性試験: 300 ppm の濃度でレタス幼根の生長をほとんど阻害した。

4. 研究成果

(1) ツバキキンカクチャワンタケ

化合物 1 の類縁物質のアガリチック酸はメシマコブやサルノコシカケに含まれる毒性物質として知られ、古くは結核患者の無汗症に使われていた。また、近年はアフリカ睡眠病 (トリパノソーマ症) の原虫に対する毒性作用 [*Int. J. Parasit.*, **31**, 482, (2001)] やラットに対するスクワレン合成酵素阻害活性 (IC_{50} 9 μ M) [*Bioorg. Med.*

Chem. Lett. 5, 2403, (1995)] の報告もある。化合物 1 はアガリチック酸のモノメチルエステル誘導体であった。そもそも、ツバキ花腐菌核病菌は、まず、ツバキキンカクチャワಂತケの胞子が花卉に付着し、発芽し、茶色斑点を形成する。その後、茶色斑点が広がり、菌核を形成する。そこで、今回単離した化合物 1 のツバキの花弁への茶色斑点の形成能を調べてみたが、はっきりとは認められなかった。今後、培養菌糸体を用い、ツバキの花弁への茶色斑点形成を調べる必要がある。

(2) シロヒナノチャワಂತケ

化合物 2 (ノルコーレンソイック酸) は、コケ類から分離の報告がなされているもの [J. A. Elix et al., Aust. J. Chem., 34, 1507, (1981)], 生理活性に関する報告は、これまでになかった。現時点では、化合物 2 とブナや殻斗分解との関連に関して、十分に考察はできないが、シロヒナノチャワಂತケから放出された胞子が至る所で発芽し、化合物 2 を生産していると仮定すると、化合物 2 の持つ抗菌作用と病原菌に抵抗性の低いブナの実生の特性とを併せて考えると、化合物 2 が何らかの形で実生の生育保護に関連しているかも知れない。一方、殻斗は非常に固く分解されにくい。しかし、ある時、一時的にシロヒナノチャワಂತケが殻斗から一斉に出現することから、シロヒナノチャワಂತケが殻斗の分解に関わりがあるかもしれない。

(3) アネモネタマチャワಂತケ

ニリンソウの近くに生息するアネモネタマチャワಂತケを探索したが、今回、研究に十分な量を採取できなかった。そこで、胞子発芽菌糸は取得できたが、菌糸が弱い
ため、適当な培養条件が見つかっていない。しかし、その過程で、菌核を形成させることに成功した。今後、それらを用いた活性物質の研究が可能である。

(4) スギエダ黒点枝枯病菌

平成 19 年および 20 年に探索したが、天

候や気温等の理由により採取が不可能であった。

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 2 件)

①塩野義人、小山浩正、小関卓也、村山哲也、植物に着生する盤菌類 (チャワಂತケ類) からの生理活性物質の探索研究、日本農芸化学大会、平成 21 年 3 月 28 日、福岡国際会議場

②塩野義人、植物に着生する盤菌類 (チャワಂತケ類) からの生理活性物質の探索研究、日本農芸化学会東北支部シンポジウム、平成 20 年 7 月 12 日、山形大学農学部

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩野 義人 (YOSHIHITO SHIONO)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：80361278

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし