

Dalbergia latifolia 心材の生物活性に関する研究

2009.3

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(山形大学)
関 根 伸 浩

目次

第 1 章 緒論	1
第 1 節 紫檀(<i>Dalbergia latifolia</i>)材の研究	1
第 2 節 ネオフラボノイドの研究	3
第 3 節 本論文の目的	5
第 2 章 <i>D. latifolia</i> 心材抽出成分の生物活性	7
第 1 節 緒言	7
第 2 節 実験方法	8
2.1 供試材	8
2.2 心材抽出物の分画と分離	8
2.2.1 逐次抽出	8
2.2.2 生物活性成分の単離	8
2.2.3 ガスクロマトグラフィーによる定量	8
2.3 単離成分の同定	8
2.4 抗蟻試験	10
2.4.1 供試シロアリ	10
2.4.2 殺蟻試験・摂食阻害試験	10
2.5 抗菌試験	11

2.5.1	供試菌	11
2.5.2	試験方法	11
第3節	結果および考察	12
3.1	ヘキササン・酢酸エチル抽出物の成分構成	12
3.2	心材抽出物とその生物活性	12
3.3	単離3成分の生物活性	13
3.4	<i>D. latifolia</i> 心材の生物活性	14
3.5	<i>D. latifolia</i> の防御機構	16
第4節	小括	18
第3章	Latifolinとその誘導体の生物活性	31
第1節	緒言	31
第2節	実験方法	32
2.1	latifolin 誘導体の調製	32
2.1.1	latifolin アセチル化	32
2.1.2	latifolin メチル化	32
2.1.3	latifolin メチル化物の分離	32
2.2	latifolin 誘導体の同定	32
2.3	抗蟻試験	34
2.3.1	供試シロアリ	34

2.3.2	殺蟻試験・摂食阻害試験	34
2.4	抗菌試験	35
2.4.1	供試菌	35
2.4.2	試験方法	35
2.5	統計的解析	35
第3節	結果および考察	36
3.1	latifolinとその誘導体の抗シロアリ活性	36
3.2	latifolinとその誘導体の抗菌活性	36
3.3	ネオフラボノイドと生物活性の関連性	37
第4節	小括	40
第4章	酢酸エチル抽出物中の着色物質の生物活性	48
第1節	緒言	48
第2節	実験方法	49
2.1	供試材	49
2.2	着色物質の分離	49
2.3	着色物質の分析	49
2.4	抗蟻試験	50
2.4.1	供試シロアリ	50
2.4.2	殺蟻試験・摂食阻害試験	50

2.5 抗菌試験	50
2.5.1 供試菌	50
2.5.2 試験方法	50
第3節 結果および考察	51
3.1 着色物質の性状	51
3.2 着色物質の生物活性	51
第4節 小括	53
第5章 総括	60
引用文献	63
謝辞	68
Summary	69
本研究に関する報告一覧	72

第 1 章 緒論

第 1 節 紫檀(*Dalbergia latifolia*)材の研究

Dalbergia 属は, *D. melanoxydon*, *D. nigra*, *D. latifolia* など約 10 種類が木材として利用されている(1)。このうち, *D. latifolia* は, 日本では紫檀と呼ばれ紫の材色が特徴的な有用銘木の一つであり, インド, ジャワが原産である。その心材は濃紫色ないしは暗紫色の母相に黒紫色の縦縞がある(1)。そのため色彩の美しさから化粧単板などに加工され, 高級家具, 指物細工, 楽器などに用いられている(1)。

一方, *D. latifolia* 材の成分研究は 1960 年代からおこなわれており, これまでにネオフラボノイドである latifolin (2-7), 4-methoxydalbergione (8-11), dalbergin (2,3), obtusaquinol (12)などの成分の単離が報告されている。

また, 生物活性物質の単離同定もおこなわれており, Findley らは, *D. latifolia* の木粉が, 健康被害として接触性皮膚炎をおこすことを報告し(13), その原因物質として, Schulz らによって 3,4-dimethoxydalbergione, 4-methoxydalbergione などが報告されている(14)。

材の耐朽性については, Syafii によって *D. latifolia* のシロアリに対する摂食阻害活性についての報告(5)や, Goncalves らの dalbergione 類のいくつかのネオフラボノイドの抗菌活性の報告(15)がある。

D. latifolia 以外の *Dalbergia* 属については, Rosado-Vallado らが *D. glabra* の根と葉のメタノール抽出物の黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*), 枯草菌(*Bacillus subtilis*)などに対する抗菌活性を報告している(16)。

また, *D. latifolia* の材色について, 心材成分が寄与していると考えられており, その成分として, 大橋らが 4-methoxydalbergione が材の退色と関係していることを報告している(4)。*D. latifolia* と同属の *D. congestiflora* から vestitol と obtusaquinone の二量体である neocandenatone を報告している(17)。同様に,

neocandenatone 類縁体の candenatone の報告もあることから(18), ネオフラボノイド二量体が材色に関与しているものと考えられている。

以上のように, *D. latifolia* については耐朽性や材色成分の研究を中心にこれまでにこなわれてきており, その成分はネオフラボノイドであり, ネオフラボノイドは *D. latifolia* を特徴付ける成分であるといえる。

第 2 節 ネオフラボノイドの研究

木材には様々な芳香族化合物が含まれており、それらには、ケイヒ酸、芳香族アミノ酸、クマリン、リグニン、リグナン、フラボノイドなど、芳香環(C6)および C3 個の側鎖の結合した構造を基本骨格としている化合物およびその誘導体が多数ある(19)。

フラボノイドは、フェニルクロマン骨格(C6-C3-C6)をもつ化合物の総称であり、配糖体として存在することも多い。そして、フラボノイド、イソフラボノイド、ネオフラボノイド、フラボノール、フラバノン、イソフラボン、アントシアニンなどに分類される(20)。フラボノイドを含む樹木は多岐にわたっており、中でも *Fagus* 属、*Acacia* 属などにフラボノイド、イソフラボノイドが含まれ、*Macherium* 属、*Dalbergia* 属にはイソフラボノイド、ネオフラボノイドが含まれている(20)。

ネオフラボノイドはフラボノイド、イソフラボノイドに比べて化合物の報告例が少なく、それを含む植物や樹木の種類も少ない。また、4-フェニルクロマンを基本骨格とし、C 環の開環しているものと開環していないものに分類される(**Figure 1.1**)(20)。

C 環の開環しているものは、Leguminosae (マメ科)、Passifloraceae (トケイソウ科)、Rubiaceae (アカネ科)、Guttiferae (オトギリソウ科)、Compositae (キク科)などに含まれていることが報告されている(20)。C 環の開環しているものは、開環しているものに比べて少ないが、Leguminosae の *Dalbergia* 属に多く、他に *Machaerium* 属、Guttiferae の *Calophyllum* 属などから報告されている(20)。

閉環型のネオフラボノイドには kuhlmannin (21), mesuol (22), などがあり、それぞれの生物活性については、細胞の酸化ストレスからの防御、HIV-1 の複製阻害などが報告されている。開環型のネオフラボノイドには dalbergione 類が皮膚炎障害をひき起こすことが報告されている(14, 23)。しかし、フラボノイド

やイソフラボノイドに比べて報告例は少ない。

以上のように、ネオフラボノイドは天然化合物としては特異な成分であり、*D. latifolia* などの特定の樹木に存在するだけで、その生物活性や材色に関する研究はまれである。

第 3 節 本論文の目的

これまで述べた研究背景から以下のように本論文での研究目的を定めた。

第 2 章では、*D. latifolia* の心材抽出物と単離成分の抗蟻・抗菌活性を調べる
こと、

第 3 章では、*D. latifolia* 心材の主要成分である開環型ネオフラボノイドの
latifolin の化学構造とその生物活性について調べること、

第 4 章では、酢酸エチル抽出物の着色物質の生物活性とその性状を明らかに
すること、

とした。

以上のことを明らかにすることで、*D. latifolia* の自己防御作用を解明し化学
生態学的に新たな知見を得ようとしたものである。

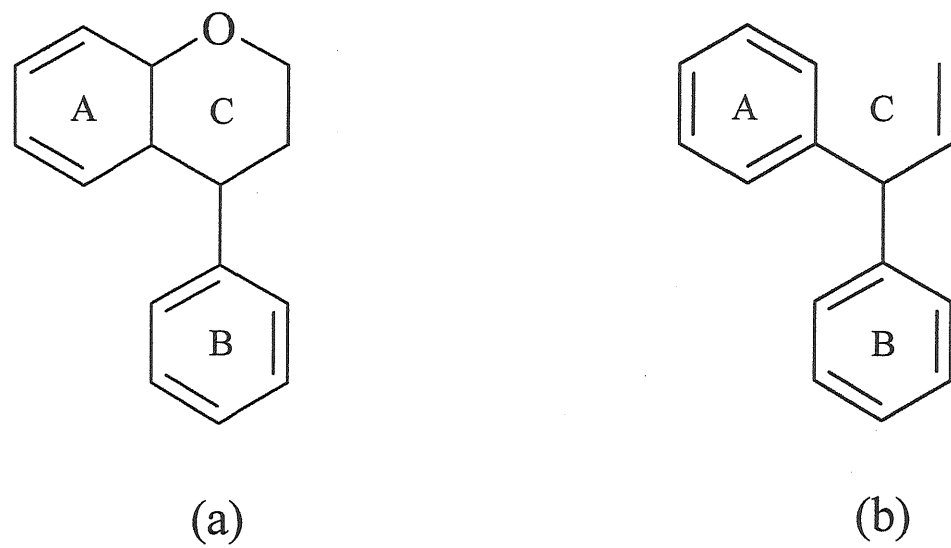


Figure 1.1. Chemical structures of neoflavonoids

Note : (a) closed type, (b) open type

第 2 章 *D. latifolia* 心材抽出成分の生物活性

第 1 節 緒言

植物の防御作用は，化学生態学において「質的防御」，「量的防御」と表現される。質的防御作用を示す物質は高い活性でもその含有量は少なく，量的防御作用を示す物質は低い活性でもその量の多さゆえに十分な効果を発揮するとされている。

樹木の防御作用も防御物質の質と量に大きく依存していると考えられる。例えば，狩野らはスギ心材を高温乾燥させると心材成分の質と量，構成が変化してシロアリに対する摂食阻害活性が低くなることを報告している(24)。また，小藤田らは，スギ樹皮に含まれている ferruginol の抗菌活性はそれほど高くないとしながらも樹皮中の含有量が豊富であるため，ferruginol が抗菌作用に重要な役割を果たしていると報告している(25)。

緒論で述べたように，*D. latifolia* の生物活性についての報告例もあるが，質と量の面からの考察や検討は不十分であると考えられる。

そこで，*D. latifolia* の自己防衛作用を解明するために心材抽出物と単離成分の抗蟻・抗菌活性を調べることにした。

第 2 節 実験方法

2.1 供試材

インドネシア産，樹齢 55 年生，*D. latifolia* 木材円盤の心材部を使用した。

2.2 心材抽出物の分画と分離

2.2.1 逐次抽出

粉碎した *D. latifolia* の心材 (1kg) を沸騰還流抽出法 (8h×3 回) により，ヘキサン，酢酸エチル，メタノールで順に逐次抽出した。

2.2.2 生物活性成分の単離

ヘキサン抽出物を，充填材として Silica gel (60N, 関東化学) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し，ベンゼンで溶出させ 11 画分を得た。Fr.4 から dalbergiphenol, Fr.5, 6 から 4-methoxydalbergione, Fr.9, 10, 11 から latifolin をそれぞれ単離した (**Figure 2.1**)。酢酸エチル抽出物についてもヘキサン抽出物と同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し，ヘキサン：酢酸エチルで溶出させ 5 画分を得た。再度，シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し，ヘキサン：酢酸エチルで溶出させ 5 画分を得た。Fr.2, Fr.3, Fr.2.4, Fr.2.5 から latifolin を単離した (**Figure 2.2**)。さらに，これらの抽出物から単離・同定された成分の化学構造を **Figure 2.3** に示す。

2.2.3 ガスクロマトグラフィーによる定量

単離した化合物 1, 2, 8 についてはそれぞれの成分ごとに検量線を作成し定量値を求めた。そのほかの成分については latifolin の検量線からそれぞれの値を求めた。GLC の条件を以下に示す。

装置：日立 G-3000 型ガスクロマトグラフ (FID 付), カラム：NB-5 キャピラリーカラム (0.25mm×30m), カラム温度：180～280℃ (4℃/min), 注入口温度：280℃, 検出器温度：280℃, キャリアーガス：He

2.3 単離成分の同定

機器分析で得られたデータを文献値のそれと比較し，心材へキサソ抽出物から単離された生物活性成分を同定した。質量分析スペクトル (MS) は日本電子 JMS-SX 102 A 高分解能質量分析計を用い，電子衝撃イオン化法 (EI) により測定した。核磁気共鳴スペクトル (NMR) には日本電子 JNM-EX 400 を用い，テトラメチルシラン (TMS) を内部標準として測定した。

R(+)-4-methoxydalbergione (4,8,11); MS, m/z (%): 51 (5), 69 (24), 91 (15), 115 (45), 128 (18), 141 (31), 143 (31), 152 (15), 165 (29), 169 (24), 183 (10), 195 (10), 211 (23), 225 (22), 239 (30), 254 (M^+ , 100), $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.80 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.93 (1H, brd, C-H_A , $J=6.23$), 5.00 (1H, ddd, $=\text{CH}_2$ *trans*, $J=17.21, 1.22, 1.22$), 5.27 (1H, ddd, $=\text{CH}_2$ *cis*, $J=10.26, 1.19, 1.19$), 5.91 (1H, s, C3-H), 6.10 (1H, ddd, C-H_X , $J=17.21, 10.30, 6.70$), 6.49 (1H, d, C6-H, $J=1.29$), 7.18-7.33 (5H, m, B-ring), $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3) δ ppm: 47.29 (C-H_A), 56.53 ($-\text{OCH}_3$), 108.16 (C3), 118.47 ($=\text{CH}_2$), 127.47 (C4'), 128.84 (C2', C6'), 129.04 (C3', C5'), 131.86 (C6), 137.51 (C-H_X), 139.61 (C1'), 151.32 (C1), 158.78 (C4), 182.62 (C5), 186.54 (C2), $[\alpha]^{21.6}_D, 31.92^\circ$ ($C = 0.25, \text{CHCl}_3$).

R(+)-dalbergiphenol (6); MS, m/z (%): 51 (1), 69 (3), 77 (2), 91 (13), 105 (2), 115 (15), 128 (5), 134 (5), 139 (5), 141 (5), 152 (8), 161 (10), 165 (12), 167 (8), 177 (6), 179 (6), 195 (10), 209 (6), 223 (10), 227 (6), 239 (10), 253 (15), 255 (10), 270 (M^+ , 100), $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.71 (3H, s, 2- OCH_3), 3.87 (3H, s, 4- OCH_3), 4.93 (1H, ddd, $=\text{CH}_2$ *trans*, $J=16.96, 1.13, 1.13$), 5.10 (1H, brd, C-H_A , $J=6.53$), 5.20 (1H, ddd, $=\text{CH}_2$ *cis*, $J=10.07, 1.18, 1.18$), 6.25 (1H, ddd, C-H_X , $J=17.09, 10.22, 6.80$), 6.50 (1H, s, C3-H), 6.73 (1H, s, C6-H), 7.14-7.27 (5H, m, B-ring), $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3) δ ppm: 47.04 (C-H_A), 56.16 (2- OCH_3), 57.00 (4- OCH_3), 97.45 (C3), 115.38 (C6), 115.93 ($=\text{CH}_2$), 124.72 (C1), 126.00 (C4'), 128.14 (C2', C6') 128.58 (C3', C5'), 139.43 (C5), 140.51 (C-H_X),

143.34 (C1'), 145.17 (C4), 150.60 (C2), $[\alpha]^{21.6}_D$, 37.52° (C = 0.25, CHCl₃).
R(-)-latifolin (2-7); MS, *m/z* (%): 69 (5), 77 (6), 91 (5), 107 (12), 115 (12), 131 (25), 139 (25), 153 (29), 154 (100), 167 (28), 180 (26), 193 (5), 211 (12), 227 (8), 239 (7), 255 (85), 269 (15), 286 (M⁺,100), ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃)
δ ppm: 3.84 (3H, s, -OCH₃), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 5.04 (1H, ddd, =CH₂ *trans*,
J=16.55, 1.51, 1.51), 5.18 (1H, ddd, C-H_A, *J*=5.86, 1.74, 1.74), 5.26 (1H,
ddd, =CH₂ *cis*, *J*=10.31, 1.40, 1.40), 6.32 (1H, ddd, C-H_X, *J*=17.09, 10.35,
5.95), 6.51 (1H, s, C3-H), 6.74 (1H, s, C6-H), 6.80-7.25 (4H, m, B-ring),
¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) δ ppm: 40.11 (C-H_A), 56.17 (2-OCH₃), 57.19 (4-OCH₃),
97.21 (C3), 115.33 (C6), 116.30, (C3'), 116.67 (=CH₂), 120.61 (C5'), 122.74 (C1),
127.71 (C6'), 128.53 (C4'), 129.42 (C1'), 139.09 (C-H_X), 140.15 (C5), 145.60 (C4),
149.55 (C2), 153.79 (C2'), $[\alpha]^{21.8}_D$, -27.12° (C = 0.5, MeOH).

2.4 抗蟻試験

2.4.1 供試シロアリ

ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus* Kolbe) は、2006年6月に山形県鶴岡市内で採集した。採取後、シロア리를、恒温室(27°C, 暗条件), 湿度 70%(RH)の環境条件で飼育し、実験に供した。

2.4.2 殺蟻試験・摂食阻害試験

両試験は既報を参考にして行なった(26-28)。φ 40 mm シャーレで検定試料(成分, 画分)を含浸させたろ紙をシロアリに強制的に捕食させる環境下で試験した。

検定試料をろ紙 (thickness, 1.5mm; φ, 8mm; Advantec, Tokyo, Japan) 重量あたり 3% (w/w) になるように含浸させた。その後, ろ紙をデシケーター中, 真空下で一晩乾燥させ溶媒を除いた。シャーレ底に少量の砂を引き, 蒸留水で均一に水分を含ませたそれぞれのシャーレにシロア리를 10 匹ずつ入れ, シャーレ中央の砂の上に試料含浸ろ紙を置き, 14 日間, 恒温室で飼育した。24 時間毎に生

存数，致死数をカウントし，生存状況，活動状況，飼育環境の確認を行った。14日後，試験に使った試料含浸ろ紙をデシケーターで一晩乾燥後，重量をはかり，シロアリ捕食によるろ紙重量の減少率を測定した。

また，この時，試料無添加のコントロールをブランクとして設置し，比較対照とした。

2.5 抗菌試験

2.5.1 供試菌

製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門 (NBRC) で分離された *Trametes versicolor* (カワラタケ) (NBRC : 30340), *Fomitopsis palustris* (オオウズラタケ) (NBRC : 30339), *Rhizopus oryzae* (NBRC : 31005), *Cladosporium cladosporioides* (NBRC : 6348)を用いた。

2.5.2 試験方法

試験は既報を参考にして行なった(25, 29)。アセトンに溶解させた検定試料を滅菌済の PGA(Potato glucose agar)培地表面上に 1cm^2 あたり $5.0\ \mu\text{g}$ になるように塗布し，風乾させた(シャーレ : $\phi 90\ \text{mm}$)。種菌コロニーの最外部を内径 5mm のコルクボーラーで打ち抜き，培地の中央に接種した。それぞれ暗所， 25.5°C で培養し，培養期間は各菌種の生育状況から *T. versicolor* では5日間，*F. palustris* では14日間，*R. oryzae* では36時間，*C. cladosporioides* では20日間とした。

コントロールとしてアセトンのみ $300\ \mu\text{l}$ を塗布したものをを用いた。経時的に平均菌糸生長直径を測定し，コントロールを基準とした生長率，阻害率を算出した。

第3節 結果および考察

3.1 ヘキサン・酢酸エチル抽出物の成分構成

抽出物量 (%) を **Table 2.1** に示す。ヘキサン抽出物，酢酸エチル抽出物，メタノール抽出物はそれぞれ 1.57, 9.00, 4.73 (%) となり，合計で 15.30%に達し他の材と比較して抽出物量が極めて多いことが示唆された。その中でも酢酸エチル抽出物は最も多く全抽出物量の 58.82%を占めていた。

ヘキサン・酢酸エチル抽出物は顕著な殺蟻・摂食阻害活性と木材腐朽菌に対する抗菌活性を示したので，構成成分の検討をおこなった。ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム (**Figure 2.4**) から抽出物の構成とその含有量 (**Table 2.2**) を求めた。8つの主要ピークが検出され，この内の **Figure 2.4** に示されるピーク 1 (t_R : 12.864 min), 2 (t_R : 13.704 min), 8 (t_R : 17.888 min) の成分を単離した。これらは GC/MS, NMR 等のデータ解析から，いずれもネオフラボノイドの 4-methoxydalbergione (ピーク 1), dalbergiphenol (ピーク 2), latifolin (ピーク 8) と同定した (**Figure 2.3, 2.4**)。また，それらの含有量はそれぞれ 2.63, 0.79, 4.50 (mg/dw) であり (**Table 2.2**)，ヘキサン抽出物全体の約 80%に達していた。

加えて，酢酸エチル抽出物のガスクロマトグラム (**Figure 2.5**) と成分構成を **Table 2.3** に示した。単離された 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol, latifolin の含有量はそれぞれ 2.29, 0.68, 10.39 (mg/dw) であり (**Table 2.3**)，酢酸エチル抽出物全体の約 60%に達していた。

さらに，ヘキサン・酢酸エチル抽出物の成分構成を **Table 2.4** に示した。これらの抽出物からは 15 の成分が認められ，単離された 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol, latifolin の含有量(相対含有率)はそれぞれ 4.92 (15.66%), 1.47 (4.69%), 14.89 (47.39%) (mg/dw)となり，これら 3 成分は抽出物の約 70%を占めていた。

3.2 心材抽出物とその生物活性

D. latifolia 心材抽出物とその生物活性について検討した。各抽出物のシロアリ、木材腐朽菌（白色腐朽菌・褐色腐朽菌）、およびカビ類に対する生物活性試験の結果を **Table 2.5** に示す。

殺蟻活性(致死率)について、メタノール抽出物 (6.67%) ではほとんど認められなかったが、ヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物で高い致死率 (73.33%, 63.33%) を示し、特にヘキサン抽出物の致死率が高かった。シロアリの摂食阻害活性 (相対ろ紙消費率) も殺蟻活性と同様にヘキサン抽出物 (25.24%), 酢酸エチル抽出物 (43.75%) が高く、特にヘキサン抽出物が高かった。なお、メタノール抽出物 (152.77%) では摂食促進効果が認められた。

木材腐朽菌に対する抗菌活性(阻害率)は、白色腐朽菌 (*T. versicolor*), 褐色腐朽菌 (*F. palustris*) の代表的な菌を用いて検討した。いずれの抽出物も木材腐朽菌に対して 20~40%の阻害率を示した。メタノール抽出物 (43.17%) は、ヘキサン抽出物 (21.74%) や酢酸エチル抽出物 (25.99%) と比較して、白色腐朽菌への活性が高かった。ヘキサン抽出物 (42.78%) や酢酸エチル抽出物 (40.03%) は、メタノール抽出物 (24.90%) と比べて褐色腐朽菌への活性が高かった。このように、白色腐朽菌と褐色腐朽菌に対する抽出物の活性の差異が示された。

カビ類に対する活性を、生長の早い菌である *R. oryzae* と生長の遅い菌である *C. cladosporioides* で検討したが、両菌に対する活性はいずれの抽出物にもほとんど認められなかった。

3.3 単離 3 成分の生物活性

Table 2.6 と **Figure 2.6** に単離成分の生物活性を示す。各成分の殺蟻活性 (致死率) は、4-methoxydalbergione (16.67%), dalbergiphenol (10.00%), latifolin (80.00%) となった。Latifolin が最も高い活性を有し、また、致死率も別に設けた無給餌条件でのそれ (16.67%) と比べてはるかに高い値を示した。摂食阻害活性 (相対ろ紙消費率) は、4-methoxydalbergione (2.63%), dalbergiphenol

(23.43%), latifolin (0.00%) となり, いずれにも認められ, 4-methoxydalbergione と latifolin が特に高かった。

このように, latifolin は殺蟻・摂食阻害活性の両方に強い活性があり, 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol は主に摂食阻害活性を有し, 単離 3 成分の活性様式が異なっていることが示唆された。

白色腐朽菌に対する抗菌活性(阻害率)は, latifolin (40.95%), 4-methoxydalbergione (30.43%) が高く, dalbergiphenol (17.49%) は相対的に低かった。褐色腐朽菌に対する活性は, 白色腐朽菌とは対照的に dalbergiphenol (46.24%) が高く, latifolin (28.61%), 4-methoxydalbergione (13.01%) は相対的に低かった。

カビ類の *R. oryzae* に対する活性は, dalbergiphenol (28.37%), 4-methoxydalbergione (13.29%) となり, 白色腐朽菌に高い活性を示した latifolin (0.00%) にはほとんど認められなかった。*C. cladosporioides* に対する活性は, 4-methoxydalbergione (7.18%) と latifolin (5.64%) で低く, dalbergiphenol (12.31%) でわずかに確認されたのみであった。

3.4 *D. latifolia* 心材の生物活性

これまでに抗蟻性成分は熱帯産広葉樹では Sandermann によってこれを 3 つの基本型, すなわち, キノン型, スチルベン型, ピロン型に総括し得ると述べられている(30)。日本国内の亜熱帯産広葉樹のセンダン(31), ヘツカニガキ(32), ハテルマギリ(33)などから nimbolin A, scopoletin, loganin などが, 温帯産広葉樹のセンノキ(34)やモッコク(35, 36)などからサポニン類が報告され, 抗蟻性成分は多岐にわたっている。それらはエーテル(31, 34)やアセトン(32, 33)などの極性の低い画分由来のものから, サポニンが含まれる水抽出画分(35, 36)などの極性の高いものまで抗蟻性が認められている。

今回の研究で, *D. latifolia* 心材では, ヘキサン抽出物, 酢酸エチル抽出物に

殺蟻・摂食阻害活性が認められた。ヘキサン抽出物から単離された3成分のネオフラボノイド (latifolin, 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol) は、いずれも親油性であり、極性の低い化合物が殺蟻・摂食阻害活性に関係していると推測される。次に活性と構造との関係を見ると、殺蟻・摂食阻害活性の強さは、latifolin > 4-methoxydalbergione > dalbergiphenol となった。つまり、ネオフラボン構造のB環のオルト位に-OH基をもつ構造が最も高く、次いでA環にキノン骨格をもつ構造が高くなり、殺蟻・摂食阻害活性にこれらの構造が関与していると推測される。この推測はより多くの構造類似体、例えば、B環オルト位の-OH基の働きであれば5-O-methylatifolinやlatifolin dimethyl ether、A環キノン構造の働きであれば4'-hydroxy-4-methoxydalbergioneや3,4-dimethoxydalbergione、4,4'-dimethoxydalbergioneなどでさらに詳細な検討が必要と考えられる。

木材腐朽菌に対する抗菌成分は、白色腐朽菌のシイタケに対してスギ、ヒノキ、マツなどのferruginol (37, 38), cedrol (39), α -cadinol (40)などに活性があるとされている。カワラタケ、オオウズラタケを用いた白色、褐色の両腐朽菌に対しては、チェンガルやパプアニューギニアローズウッド由来の加水分解型タンニン(41), angolensin (42)はカワラタケの方が、ヒノキアスナロの葉油(43)はオオウズラタケの方が活性は高いとされている。ヒノキのセスキテルペンアルコール(44)はどちらにも差異なく活性はあるとされている。

木材腐朽菌以外のカビ類に対する抗菌成分は、コナラ、トキワガキ、シナノガキ由来ではポリフラバノール(45)やisodiospyrin (46)などが、スギ、ヒノキ由来ではワックス(47), ferruginol (25), α -cadinol (48)などが報告され、多岐にわたっている。

D. latifolia 心材では、抽出物とそれぞれの菌に対する活性の強さは、白色腐朽菌では、メタノール抽出物 > 酢酸エチル抽出物 > ヘキサン抽出物となり、

褐色腐朽菌では，ヘキサン抽出物 > 酢酸エチル抽出物 > メタノール抽出物となり，カビ類 (*R. oryzae*, *C. cladosporioides*) では，酢酸エチル抽出物 > ヘキサン抽出物・メタノール抽出物となった。このように，白色腐朽菌，褐色腐朽菌，カビ類に対して抗菌活性を示す抽出物が異なることが示された。

単離 3 成分とそれぞれの菌に対する活性の強さは，白色腐朽菌では，latifolin > 4-methoxydalbergione > dalbergiphenol となり，褐色腐朽菌では，dalbergiphenol > latifolin > 4-methoxydalbergione となった。カビ類 (*R. oryzae*, *C. cladosporioides*) では，dalbergiphenol > 4-methoxydalbergione > latifolin となった。

活性と成分の構造との関係を見ると，白色腐朽菌には，シロアリと同様に，latifolin のネオフラボン構造の B 環のオルト位に -OH 基をもつ構造が有効であるが，褐色腐朽菌やカビ類には，dalbergiphenol のように B 環のオルト位に -OH 基をもたない構造が有効であると考えられる。-OH 基やキノン構造が活性に関与していると推測され，シロアリと同様にさらに詳細な検討が必要と考えられる。

3.5 *D. latifolia* の防御機構

D. latifolia の防御機構について，心材抽出物と単離 3 成分の生物活性の面から考察する。

心材中のヘキサン抽出物と酢酸エチル抽出物はシロアリと褐色腐朽菌に，メタノール抽出物は白色腐朽菌に，それぞれ防御作用があり抽出物毎に活性発現様式の特異性が認められた。また，カビ類に対しては，心材抽出物は防御作用をもっていないことが明らかになった。

単離 3 成分の構造と生物活性について考察すると，ネオフラボン骨格の B 環のオルト位に -OH 基をもつ構造の latifolin は殺蟻・摂食阻害活性と白色腐朽菌への抗菌活性を，B 環のオルト位に -OH 基をもたない構造の dalbergiphenol は

摂食阻害活性と褐色腐朽菌およびカビ類への抗菌活性を，A環がキノン構造をもつ 4-methoxydalbergione は摂食阻害活性と白色腐朽菌への抗菌活性をそれぞれ示した。つまり，B環オルト位の-OH基の有無およびA環のキノン構造の存在が活性の特異性に影響を及ぼしていた。

このように，*D. latifolia* は心材抽出成分の多様化およびネオフラボノイドの部分構造の変化によって生物に対する多様な防御作用を生み出していると推測された。

第 4 節 小括

D. latifolia 心材抽出物のヤマトシロアリ, 木材腐朽菌, カビに対する生物活性を検討した。

心材のヘキサン・酢酸エチル抽出物は顕著な殺蟻・摂食阻害活性と木材腐朽菌に対する抗菌活性が認められ, 主要成分であるネオフラボノイドの *latifolin*, *dalbergiphenol*, *4-methoxydalbergione* を活性成分として単離・同定した。その 3 成分の中では, 含有量は *latifolin* が最も高くなった。生物活性においても, *latifolin* は高い殺蟻・摂食阻害活性とカワラタケ (*Trametes versicolor*) に対する高い抗菌活性が認められた。*Dalbergiphenol* はシロアリへの摂食阻害活性, オウズラタケ (*Fomitopsis palustris*), *Rhizopus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides* に対する高い抗菌活性が認められた。*4-Methoxydalbergione* は摂食阻害活性とカワラタケに対する抗菌活性が認められた。それらの構造を比較すると B 環オルト位の -OH 基の有無および A 環のキノン構造の存在が生物活性発現の特異性に影響を及ぼしていた。

このように, *D. latifolia* は心材抽出成分の多様化およびネオフラボノイドの部分構造の変化によって生物に対する多様な防御作用を生み出していると推測された。

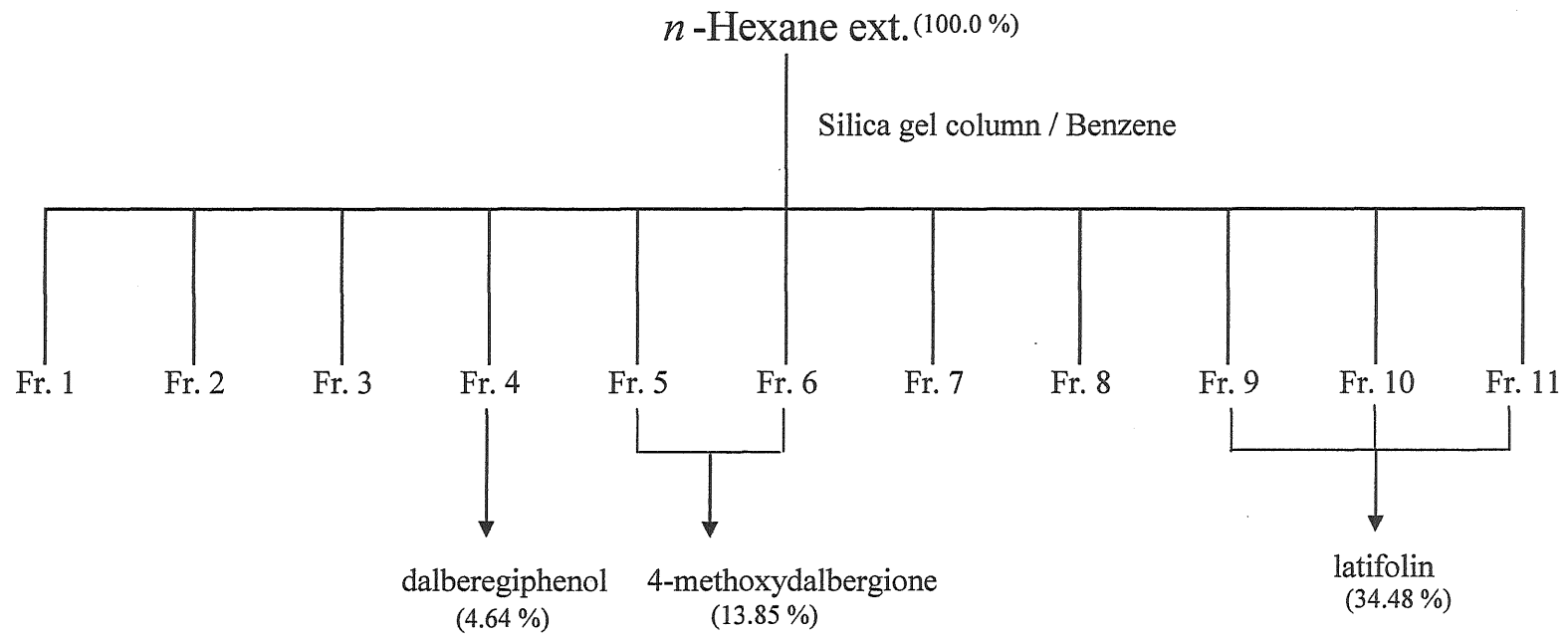


Figure 2.1. Isolation scheme of *n*-hexane extract of *D. latifolia* heartwood.

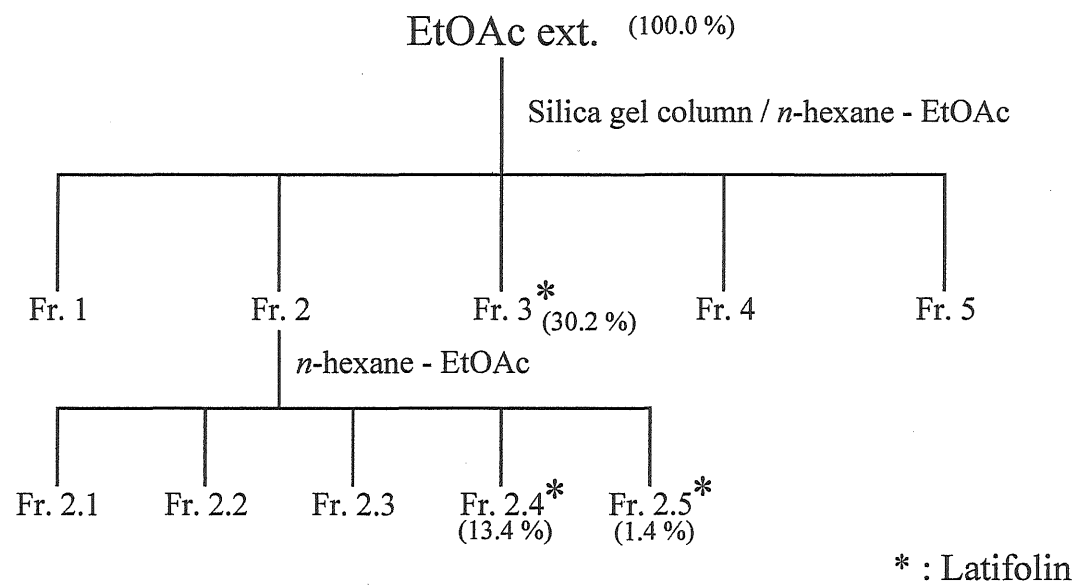


Figure 2.2. Isolation scheme of EtOAc extract of *D. latifolia* heatwood.

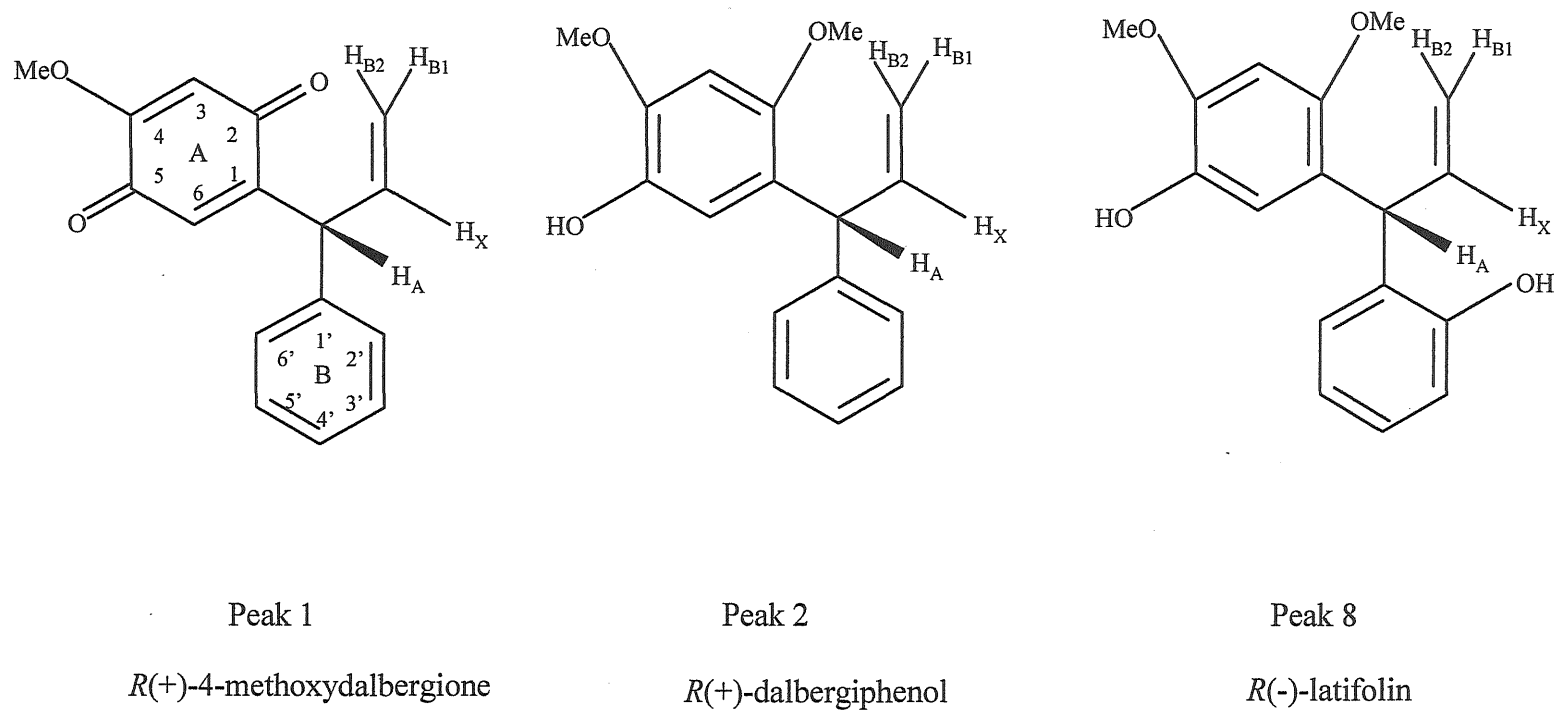


Figure 2.3. Chemical structures of bioactive substances from *D. latifolia* heartwood

Note : Peak No. see in Figure 4, Peak.1 : *R(+)*4-methoxydalbergione, Peak.2 : *R(+)*-dalbergiphenol, Peak.8 : *R(-)*-latifolin

Table 2.1. Yield (%) of extracts of *D. latifolia* heartwood.

	The extracts			Total
	<i>n</i> -Hexane	EtOAc	MeOH	
Yield ¹⁾	1.57	9.00	4.73	15.30
Constitution ratio ²⁾	10.26	58.82	30.92	100.00

Note : 1) Yield (%) = weight of extract (g) / weight of heartwood (g)

2) Constitution ratio (%) = yield of extract (%) / yield of total (%) × 100

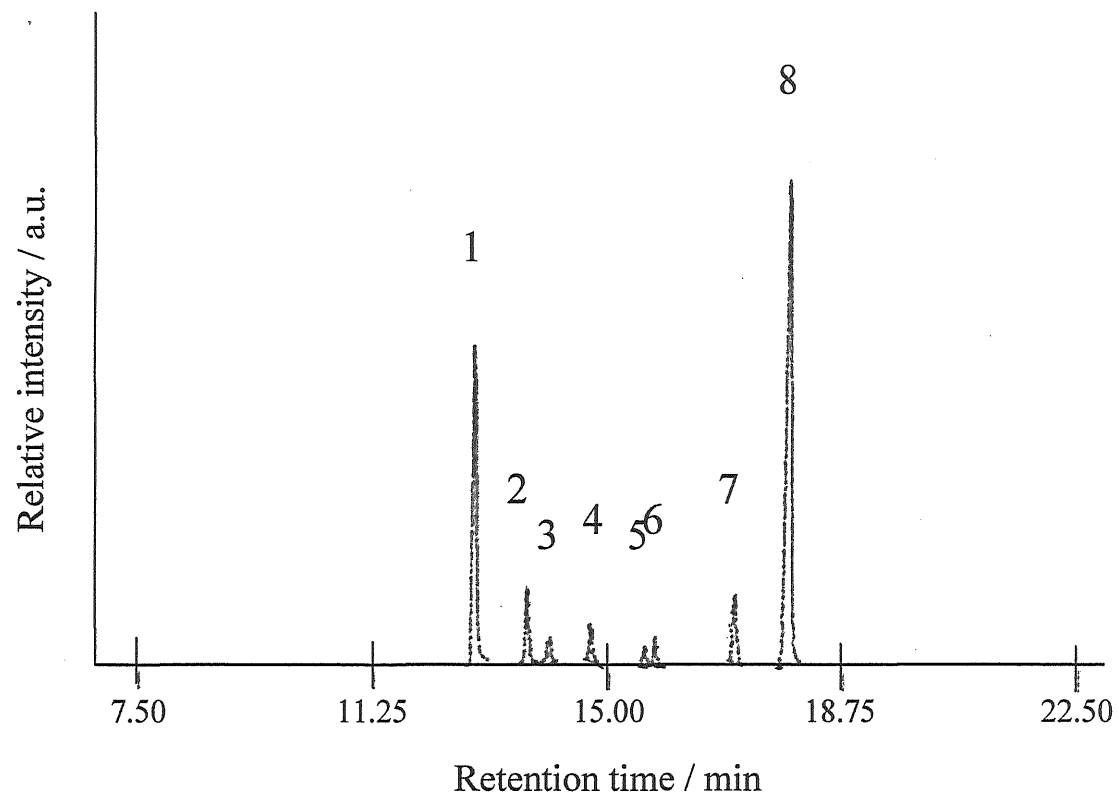


Figure 2.4. Gas chromatogram of *n*-hexane extract from *D. latifolia* heartwood detected with FID.

Note : Numerals 1-8 refer to those shown in Table 2.2. and Figure 2.3.

Table 2.2. Constituents in the *n*-hexane extracts from *D. latifolia* heartwood.

	Peak No. (t_R) ¹⁾								Total
	1 (12.864)	2 (13.704)	3 (14.058)	4 (14.720)	5 (15.573)	6 (15.744)	7 (16.992)	8 (17.888)	
Content ²⁾	2.63	0.79	0.23	0.65	0.18	0.27	0.77	4.50	10.03
Relative content ³⁾	26.23	7.88	2.32	6.48	1.84	2.71	7.68	44.88	100.00

Note : 1) The amount of compounds was determined by GLC analysis. The No.(Rt) shows GLC peak No. and its retention time (see Figure 2.4). The peaks 1, 2 and 8 were identified as 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol and latifolin, respectively.

2) Content : mg/dw

3) Relative content (%) = content of compound / content of total \times 100

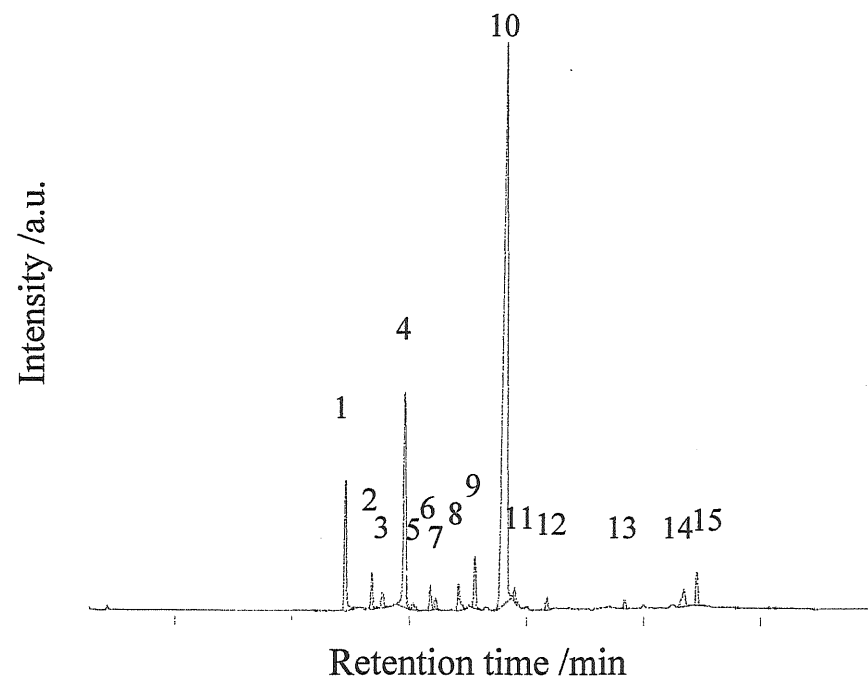


Figure 2.5. Gas chromatogram of EtOAc extract from *D. latifolia* heartwood

Note : Numerals 1-15 in the chromatogram profile correspond to the same numbers in Table 2.3.

Table 2.3. Content of compounds isolated from EtOAc extract of *D. latifolia* heartwood

	Peak No. (t _R) ¹⁾															Total
	1 (12.960)	2 (13.802)	3 (14.165)	4 (14.869)	5 (15.114)	6 (15.680)	7 (15.850)	8 (16.586)	9 (17.109)	10 (18.112)	11 (18.389)	12 (19.413)	13 (21.909)	14 (23.797)	15 (24.202)	
Content ²⁾	2.29	0.68	0.29	4.00	0.13	0.47	0.19	0.50	0.94	10.39	0.22	0.24	0.14	0.32	0.60	21.40
Relative content ³⁾	10.72	3.19	1.33	18.68	0.61	2.18	0.89	2.35	4.41	48.56	1.01	1.13	0.65	1.50	2.79	100.00

Note : 1) The amount of compounds was determined by GLC analysis. The No.(Rt) shows GLC peak No. and its retention time (see Figure 2.5). The peaks 1, 2 and 10 were identified as 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol and latifolin, respectively.

2) Content : mg/dw

3) Relative content (%) = content of compound / content of total × 100

Table 2.4. Total content of compounds from *n*-hexane and EtOAc extracts.

	Peak No. (t _R)															Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
H-Content ¹⁾	2.63	0.79	0.23	0.65		0.18	0.27		0.77	4.50						10.03
E-Content ²⁾	2.29	0.68	0.29	4.00	0.13	0.47	0.19	0.50	0.94	10.39	0.22	0.24	0.14	0.32	0.60	21.40
T-Content ³⁾	4.92	1.47	0.52	4.65	0.13	0.65	0.46	0.50	1.71	14.89	0.22	0.24	0.14	0.32	0.60	31.43
Relative content ⁴⁾	15.66	4.69	1.65	14.79	0.41	2.07	1.47	1.60	5.45	47.39	0.69	0.77	0.44	1.02	1.90	100.00

Note : 1) H-Content refer to Table 2.2.

2) E-Content refer to Table 2.3.

3) T-Content (mg/dw) = H-Content (mg/dw) + E-Content (mg/dw)

4) Relative content (%) = T-Content of compound / content of total × 100

Table 2.5. Bioactivity of extracts of *D. latifolia* heartwood.

			The extracts			Blank
			<i>n</i> -Hexane	EtOAc	MeOH	
Termite ¹⁾	mortality	dead numbers (n=30)	22	19	2	0
		mortality (%)	73.33	63.33	6.67	0.00
	antifeedant	mass loss of paper disc (mg)	1.02	1.77	6.19	3.94
		mass loss (%)	3.19	5.53	19.31	12.64
		relative mass loss (%)	25.24	43.75	152.77	100.00
	Fungus ²⁾	white rot fungi (<i>T. versicolor</i>)	growth in diameter (mm)	64.50	61.00	46.83
growth rate (%)			78.26	74.01	56.83	100.00
inhibition rate (%)			21.74	25.99	43.17	
brown rot fungi (<i>F. palustris</i>)		growth in diameter (mm)	34.67	36.33	45.50	60.58
		growth rate (%)	57.22	59.97	75.10	100.00
		inhibition rate (%)	42.78	40.03	24.90	
<i>R. oryzae</i>		growth in diameter (mm)	84.00	79.00	84.00	84.00
		growth rate (%)	100.00	94.05	100.00	100.00
		inhibition rate (%)	0.00	5.95	0.00	
<i>C. cladosporioides</i>		growth in diameter (mm)	32.50	30.17	32.33	32.50
		growth rate (%)	100.00	92.82	99.49	100.00
		inhibition rate (%)	0.00	7.18	0.51	

Note : 1) Test samples were treated with 3% (w/w) of paper disc weight (mg).

Mortality (%) = number of dead termites after 14 days of tests / number of initial termites of tests x 100, Mass loss (%) = weight of paper disc after 14 days of tests (mg) / weight of initial paper disc of tests (mg) x 100, Relative mass loss (%) = mass loss of each sample (%) / mass loss of blank (%) x 100

2) Test samples were treated and spread on the surface of PGA medium at 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Growth rate (%) = mycelial growth in diameter of each sample (mm) / mycelial growth in diameter of blank (mm) x 100,

Inhibition rate (%) = 100 - growth rate (%)

Table 2.6. Bioactivity of compounds from *n*-hexane extract of *D. latifolia* heartwood.

			The compounds ¹⁾			Blank
			Md	Dp	La	
Termite ²⁾	mortality	dead numbers (n=30)	5	3	24	0
		mortality (%)	16.67	10.00	80.00	0.00
	antifeedant	mass loss of paper disc (mg)	0.10	0.17	0.00	3.94
		mass loss (%)	0.33	2.96	0.00	12.64
	relative mass loss (%)	2.63	23.43	0.00	100.00	
Fungus ³⁾	white rot fungi (<i>T. versicolor</i>)	growth in diameter (mm)	57.33	68.00	48.67	82.42
		growth rate (%)	69.57	82.51	59.05	100.00
		inhibition rate (%)	30.43	17.49	40.95	
	brown rot fungi (<i>F. palustris</i>)	growth in diameter (mm)	50.17	31.00	41.17	57.67
		growth rate (%)	86.99	53.76	71.39	100.00
		inhibition rate (%)	13.01	46.24	28.61	
	<i>R. oryzae</i>	growth in diameter (mm)	72.83	60.17	84.00	84.00
		growth rate (%)	86.71	71.63	100.00	100.00
		inhibition rate (%)	13.29	28.37	0.00	
	<i>C. cladosporioides</i>	growth in diameter (mm)	30.17	28.50	30.67	32.50
		growth rate (%)	92.82	87.69	94.36	100.00
		inhibition rate (%)	7.18	12.31	5.64	

Note : 1) Md : 4-methoxydalbergione ; Dp : dalbergiphenol ; La : latifolin

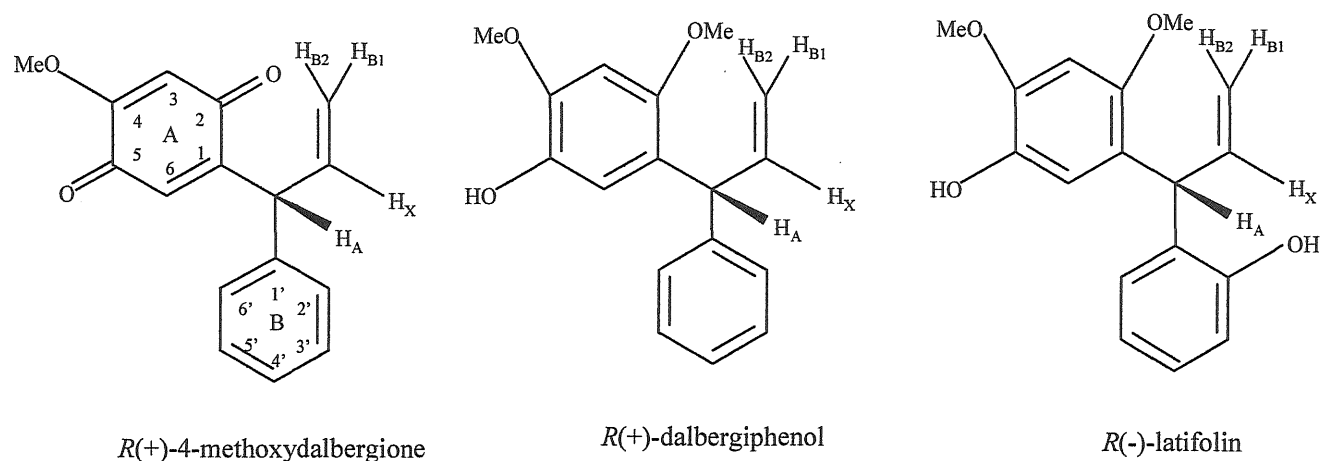
2) Test samples were treated with 3% (w/w) of paper disc weight (mg).

Mortality (%) = number of dead termites after 14 days of tests / number of initial termites of tests x 100, Mass loss (%) = weight of paper disc after 14 days of tests (mg) / weight of initial paper disc of tests (mg) x 100, Relative mass loss (%) = mass loss of each sample (%) / mass loss of blank (%) x 100

3) Test samples were treated and spread on the surface of PGA medium at 5.0 μ g/cm²

Growth rate (%) = mycelial growth in diameter of each sample (mm) / mycelial growth in diameter of blank (mm) x 100,

Inhibition rate (%) = 100 - growth rate (%)



Bioactivity ¹⁾		Compound ²⁾		
		Md	Dp	La
Termite	Mor	+	+	++++
	Mas	+	+	++
Fungus	W-inh	++	+	++
	B-inh	+	++	+
	R-inh	+	+	-
	C-inh	-	+	-

Figure 2.6. Summary of bioactivity of the constituents *D. latifolia* heartwood.

Note : 1) Mor means the mortality rate of termites in Table 6. : $10.0\leq <30.0(\%)$, $30.0\leq ++ <50.0(\%)$, $50.0\leq +++ <70.0(\%)$, $70.0(\%)\leq ++++$,
 Mas means the mass loss of termites in Table 6. : $0\leq ++ <0.1(\text{mg})$, $0.1\leq + <0.2(\text{mg})$,

W-inh ,B-inh, R-inh and C-inh mean the inhibition rates of white-rot and brown-rot fungi, *R. oryzae* and *C. cladosporioides*
 in Table 6. : $0.0\leq - <10.0(\%)$, $10.0\leq + <30.0(\%)$, $30.0\leq ++ <50.0(\%)$

2) Md : 4-methoxydalbergione, Dp : dalbergiphenol, La : latifolin

第 3 章 Latifolin とその誘導体の生物活性

第 1 節 緒言

緒論で述べたように、ネオフラボノイドは天然化合物としては特異な成分であり、*D. latifolia* などの特定の樹木に存在するだけで、その生物活性に関する研究はまれである。第 2 章で、*D. latifolia* 心材抽出物から開環型ネオフラボノイドである 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol, latifolin を単離しこれらの生物活性と構造相関を調べた(49)。また単離した 3 成分では、latifolin は生物活性が最も高く、ヘキサン・酢酸エチル抽出物中の含有率も最も多いネオフラボノイド化合物であることが判明した。

化学構造と生物活性の関係については、ベンゾキノン類の抗蟻活性(50)や、eremophilane のファイトトキシシンや抗菌作用などの報告があり(51)、構造と活性相関の重要性が指摘されている。しかしながら、緒論でも述べたように、ネオフラボノイドについてのこのような研究例はない。

そこで、*D. latifolia* 心材の主要成分である latifolin の化学構造とその生物活性について調べることにした。

第 2 節 実験方法

2.1 latifolin 誘導体の調製

2.1.1 latifolin アセチル化

第 2 章で得られた latifolin (49)(50mg)をピリジン(2ml)に溶かし, さらに無水酢酸(2ml)を加え, スターラーで一晩攪拌した。反応後の濃縮残渣を酢酸エチルで分配抽出した。

2.1.2 latifolin メチル化

KOH と *p*-tolylsulfonylmethylnitrosoamide との反応により diazomethane エーテル溶液を調製した。調製溶液を latifolin (50mg) (49)に加え, 氷冷下で一晩メチル化反応させ, 濃縮後, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

2.1.3 latifolin メチル化物の分離

反応後のメチル化物は, 充填材として Silica gel (60N, 関東化学) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し, ヘキサン, 酢酸エチルで溶出させ 64 画分を得た。Fr.1-14 から latifolin dimethyl ether, Fr.15-31 から 2'-*O*-methyllatifolin, Fr.37-50 から 5-*O*-methyllatifolin, Fr.56-64 から latifolin をそれぞれ単離した。

2.2 latifolin 誘導体の同定

Latifolin とその誘導体は GLC/MS, NMR, 旋光度などのスペクトル分析に供した。GLC/MS には SHIMADZU QP-5000 を用い, DB-1(30 m×0.32 mm i.d.; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)カラムを使用した。分析条件は, カラム温度は, 150°C で 1 分保持した後, 5°C/min 昇温させ, 320°C で 5 分保持とした。インジェクターの温度は 230°C, ディテクターの温度は 250°C, 測定質量範囲は 50-450 とし, キャリアーガスには He(1.7 ml/min)を用いた。1D と 2D NMR 分析には JEOL JNM-EX400 (¹H 400 MHz / ¹³C 100 MHz) を用い, 旋光度分析には Horiba SEPA-300 を用いた。Latifolin と誘導体の化学構造と

2'-*O*-methyllatifolin と 5-*O*-methyllatifolin の NOE 相関はそれぞれ **Figure 3.1, 3.2** で示した。

R(-)-*latifolin* (1) (49)

MS, *m/z* (rel. int.) : 286 [M]⁺ (47), 269 (4), 255 (25), 240 (3), 227 (3), 211 (4), 193 (2), 180 (9), 167 (12), 154 (100), 139 (16), 133 (13), 131 (13), 115 (10), 107 (12), 105 (6), 91 (7), 77 (13), 69 (15), 65 (7), 51 (8), ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δppm : 3.84 (3H, s, -OCH₃), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 5.04 (1H, ddd, =CH₂ *trans*, *J*=16.55, 1.51, 1.51), 5.18 (1H, ddd, C-H_A, *J*=5.86, 1.74, 1.74), 5.26 (1H, ddd, =CH₂ *cis*, *J*=10.31, 1.40, 1.40), 6.32 (1H, ddd, C-H_X, *J*=17.09, 10.35, 5.95), 6.51 (1H, s, C3-H), 6.74 (1H, s, C6-H), 6.80-7.25 (4H, m, B-ring), ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) δppm : 40.11 (C-H_A), 56.17 (2-OCH₃), 57.19 (4-OCH₃), 97.21 (C3), 115.33 (C6), 116.30, (C3'), 116.67 (=CH₂), 120.61 (C5'), 122.74 (C1), 127.71 (C6'), 128.53 (C4'), 129.42 (C1'), 139.09 (C-H_X), 140.15 (C5), 145.60 (C4), 149.55 (C2), 153.79 (C2'), [α]^{21.8}_D, -27.12° (C = 0.5, MeOH).

2'-*O*-methyllatifolin (2)

MS, *m/z* (rel. int.) : 300 [M]⁺ (100), 285 (8), 271 (16), 253 (8), 237 (7), 225 (8), 209 (8), 192 (19), 177 (16), 167 (25), 163 (24), 161 (22), 137 (38), 121 (42), 115 (41), 107 (17), 105 (17), 91 (64), 77 (37), 69 (51), 58 (42), ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δppm : 3.65 (3H, s, -OCH₃), 3.69 (3H, s, -OCH₃), 3.80 (3H, s, -OCH₃), 4.70 (1H, ddd, =CH₂ *trans*, *J*=17.08, 1.71, 1.71), 5.07 (1H, ddd, =CH₂ *cis*, *J*=10.18, 1.59, 1.59), 5.36 (1H, brd, C-H_A, *J*=5.92), 6.13 (1H, ddd, C-H_X, *J*=17.20, 10.41, 5.54), 6.44 (1H, s, C3-H), 6.60 (1H, s, C6-H), 6.77-7.13 (4H, m, B-ring), ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) δppm : 41.56 (C-H_A), 57.16 (-OCH₃), 57.53 (-OCH₃), 58.85 (-OCH₃), 99.32 (C3), 111.52 (C1), 112.27 (C3') 116.75 (C6), 116.93 (=CH₂), 119.17 (C1'), 121.72 (C5'), 128.69 (C4'), 130.75 (C6'), 140.64 (C5), 141.64 (C-H_X), 146.36 (C4), 152.27 (C2),

158.50 (C2').

5-O-methylatifolin (3)

MS, *m/z* (rel. int.) : 300 [M]⁺ (27), 285 (1), 269 (11), 253 (2), 241 (2), 225 (3), 210 (2), 194 (5), 181 (12), 168 (100), 153 (32), 131 (14), 115 (8), 107 (13), 91 (9), 77 (15), 69 (19), 51 (8), ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δppm : 3.74 (3H, s, -OCH₃), 3.84 (3H, s, -OCH₃), 3.85 (3H, s, -OCH₃), 5.01 (1H, ddd, =CH₂ *trans*, *J*=17.33, 1.68, 1.68), 5.20 (1H, brd, C-H_A, *J*=5.68), 5.27 (1H, ddd, =CH₂ *cis*, *J*=10.38, 1.65, 1.65), 6.32 (1H, ddd, C-H_X, *J*=17.21, 10.04, 5.17), 6.53 (1H, s, C3-H), 6.67 (1H, s, C6-H), 6.80-7.15 (4H, m, B-ring), ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) δppm : 41.68 (C-H_A), 57.56 (-OCH₃), 58.00 (-OCH₃), 58.42 (-OCH₃), 99.37 (C3), 114.64 (C6), 117.78 (C1), 118.19 (=CH₂), 122.00 (C3'), 122.74 (C1') 129.17 (C5') 129.80 (C4'), 130.71 (C6'), 140.51 (C-H_X), 145.14 (C5), 149.92 (C2), 151.61 (C4), 155.27 (C2').

latifolin dimethyl ether (4)

MS, *m/z* (rel. int.) : 314 [M]⁺ (100), 299 (15), 283 (19), 267 (6), 253 (5), 241 (5), 225 (6), 207 (7), 191 (11), 181 (25), 175 (22), 165 (15), 151 (32), 145 (31), 131 (23), 121 (43), 115 (31), 107 (14), 105 (14), 91 (54), 77 (25), 69 (33), 55 (9).

latifolin diacetate (5)

MS, *m/z* (rel. int.) : 370 [M]⁺ (15), 328 (100), 311 (1), 297 (5), 285 (47), 270 (11), 255 (81), 237 (4), 227 (6), 211 (6), 191 (5), 181 (9), 167 (21), 154 (34), 139 (10), 133 (12), 131 (22), 115 (11), 107 (11), 91 (9), 77 (11), 69 (21), 55 (7).

2.3 抗蟻試験

2.3.1 供試シロアリ

第2章の2.4.1の実験方法に準じた。採取時期は2008年5月とした。

2.3.2 殺蟻試験・摂食阻害試験

第2章の2.4.2の実験方法に準じた。試験終了後のlatifolinの致死率および

ろ紙消費率を 1.00 としてそれぞれ殺蟻活性，摂食阻害活性とした。

2.4 抗菌試験

2.4.1 供試菌

第 2 章の 2.5.1 の実験方法に準じた。

2.4.2 試験方法

第 2 章の 2.5.2 の実験方法に準じた。

2.5 統計的解析

生物活性試験の結果は，SPSS 10.0($p < 0.05$, SPSS Inc.)を用いて統計的解析である一元配置分散分析(ANOVA)および Fisher least-significant difference (LSD) 検定による多重比較をおこなった。殺蟻試験の LSD 検定ではそれぞれの試料の致死率を平方根，アークサイン(\arcsin)の順に数値変換処理をおこない，その有意差を検討した。

第3節 結果および考察

3.1 latifolin とその誘導体の抗シロアリ活性

Figure 3.3 に latifolin とその誘導体の殺蟻活性を示す。latifolin の致死率(1.00) に対する各誘導体の相対値は, 2'-*O*-methyllatifolin は 1.75, 5-*O*-methyllatifolin は 1.13, latifolin dimethyl ether は 2.13, latifolin diacetate は 2.00 となった。誘導体の活性は 2'-*O*-methyllatifolin, latifolin dimethyl ether, latifolin diacetate が latifolin の約 2 倍高くなったが, 5-*O*-methyllatifolin だけは latifolin と同じ程度の値であった。ジメチル誘導体(latifolin dimethyl ether)とジアセチル誘導体(latifolin diacetate)は 7 日目以降から致死率の急激な増加が認められた。なお, 試験最終日の latifolin の致死率は, 26.7%であった。

さらに, **Figure 3.4** に latifolin とその誘導体の相対的摂食量を示す。試験最終日の latifolin の摂食量(相対ろ紙消費率)を 1.00 とした各誘導体の相対値は, 2'-*O*-methyllatifolin は 1.98, 5-*O*-methyllatifolin は 3.25, latifolin dimethyl ether は 3.42, latifolin diacetate は 2.89 となった。なお, latifolin, blank のろ紙消費量は, 0.39mg, 7.67mg であった。摂食量は latifolin が最も少なく, 次いで 2'位がメチル化された 2'-*O*-methyllatifolin が少なくなった。ジメチル誘導体(latifolin dimethyl ether)やジアセチル誘導体(latifolin diacetate), 5 位がメチル化された 5-*O*-methyllatifolin は, latifolin の約 3 倍の摂食量となり多かった。

3.2 latifolin とその誘導体の抗菌活性

Figure 3.5 に latifolin とその誘導体の抗菌活性を示す。白色腐朽菌に対する抗菌活性(阻害率)は, latifolin は 79.1%, 2'-*O*-methyllatifolin は 16.5%, 5-*O*-methyllatifolin は 13.2%, latifolin dimethyl ether は 15.3%, latifolin diacetate は 21.8%となり, latifolin は高い活性を示したが, いずれの誘導体も活性が明らかに低下した。褐色腐朽菌に対する活性は, latifolin は 37.5%, 2'-*O*-methyllatifolin は 18.3%, 5-*O*-methyllatifolin は -0.5%, latifolin dimethyl ether

は-9.6%, latifolin diacetate は 1.4%となり, 誘導体化により活性は低下した。しかし, 2'-*O*-methyllatifolin のみが約 1/2 の活性低下に留まった。

カビ類の *R. oryzae*, *C. cladosporioides* に対する活性は, latifolin もその誘導体も低い活性となった。

3.3 ネオフラボノイドと生物活性の関連性

これまで, 化合物とその誘導体の抗シロアリ活性について, Stilbene の isorhapontigenin がメチル化されると, 殺蟻活性が高くなることを報告している(52)。そして, deacetylgedunin, 17-hydroxyazadiradione, nimbadiol とそれらの誘導体の摂食阻害活性を比較し, それらの構造が-OH 基をもつことで活性が高くなることを報告している(53)。さらに, フラボノイドと関連化合物のイエシロアリ (*Coptotermes formosanus* Shiraki) に対する摂食阻害活性については, Ohmura らが quercetin, taxifolin, naringetin の高い活性は-OH 基の位置が影響することを報告している(54)。

このように, 化合物は構造に付加される-OH 基や-OMe 基の有無, その位置, などが抗シロアリ活性に影響を及ぼしているとされている。

まず, 殺蟻活性は, 5位のメチル化物である 5-*O*-methyllatifolin を除いた誘導体がメチル化やアセチル化によって活性が約 2 倍に高まった。5位のメチル化では活性にほとんど変化がないが, 2'位がメチル化されるだけで高い活性を示した。また, latifolin の約 2 倍の活性を示した 2'-*O*-methyllatifolin, latifolin dimethyl ether, latifolin diacetate でも致死率の増加パターンに差異が認められた(Figure 3.3)。つまり, 2'-*O*-methyllatifolin の致死率が一定の割合で増加していくのに対して, latifolin dimethyl ether や latifolin diacetate のそれは 7 日目頃から急激に増加し, 特に latifolin diacetate が顕著であった。

次に, 摂食量は誘導体化されることで 2 倍以上多くなった。特に, 2'-*O*-methyllatifolin と 5-*O*-methyllatifolin の摂食量を比べると 2'位のメチル化

よりも5位がメチル化されると摂食量は増加した。このことから5位のメチル化が摂食量の増加には有効であった。

さらに、致死率と摂食量との関係を見ると、2'位がメチル化された2'-*O*-methyllatifolinは、致死率がほぼ一定割合で増加していることから、摂食量が増えたことで致死率が増加したと推測された。一方、5位がメチル化された5-*O*-methyllatifolinは、摂食量は3倍以上増加するが致死率は増加しない。つまり、5-*O*-methyllatifolinのシロアリに対する毒性や摂食阻害活性は、2'-*O*-methyllatifolinより低下していた。このことから、A環の5位のメチル化によってlatifolinの抗シロアリ活性が変化していると考えられた。それゆえに、latifolinのB環の2'位の-OH基よりもA環の5位の-OH基が殺蟻活性や摂食阻害活性に寄与していると推測された。

そして、latifolin dimethyl etherやlatifolin diacetateは、摂食量が約3倍増加するにもかかわらず、7日目までは致死率が低く、latifolinの活性が無毒化されていると思われる。しかし、7日目以降で致死率が急激に増加し活性の発現が認められた。これまでに、シロアリの代謝については、シロアリ体内の還元的酢酸生成細菌がバニリンやシリंगा酸を嫌氣的脱メチル化することが報告されている(55-57)。つまり、latifolin dimethyl etherやlatifolin diacetateは、メチル化やアセチル化によってシロアリ体内に蓄積された後、脱メチル化または脱アセチル化によりlatifolinに変化することで遅れた活性の発現がおこっていると推測される。このことは、特に、latifolin diacetateでは顕著であった。

一方、化合物とその誘導体の抗菌活性について、Schultzらがstilbeneとその誘導体が白色腐朽菌(*Coriolus versicolor*)と褐色腐朽菌(*Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta*)に対し、hydrophobicityと相関があることを見出している(58, 59)。

このように、前述した抗シロアリ活性と同様に、化合物の構造に付加される官能基や疎水性などが抗菌活性にも影響を及ぼしているとされている。

次に、抗菌活性については、まず、白色腐朽菌では、いずれの誘導体でも活性が大きく低下した。また、5位と2'位のモノメチル化物にも活性の差異は認められず、このことから、5位と2'位の両方の-OH基が活性に大きく寄与していると推測された。さらに、褐色腐朽菌に対する活性は、2'位のメチル化よりも5位がメチル化されると活性が低くなることから、特に、5位の-OH基が活性に寄与していると推測された。

Latifolinとその誘導体の生物活性について **Figure 3.6** にまとめ、さらに、その結果を統計的に解析し、**Table 3.1** に示した。解析によって latifolin とその誘導体の生物活性に有意な差が認められた。

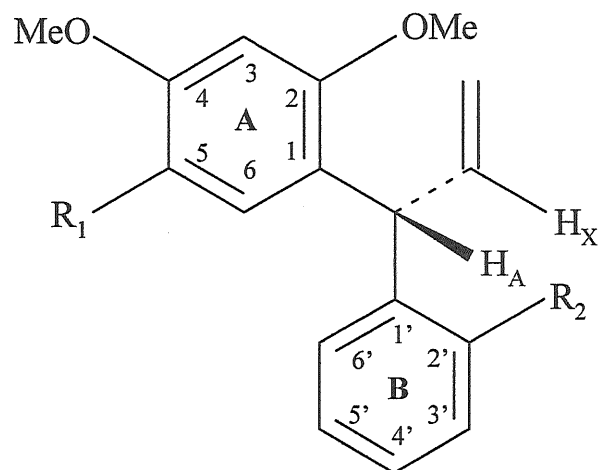
ネオフラボノイドである latifolin の生物活性は、-OH基の位置に大きく依存していた。抗シロアリ活性(殺蟻活性、摂食阻害活性)には、特に5位の-OH基が、木材腐朽菌(白色腐朽菌、褐色腐朽菌)への抗菌活性には、5位と2'位の両方の-OH基が、有効かつ活性発現の必須要因であると判断された。

第 4 節 小活

D. latifolia 心材の主要成分である開環型ネオフラボノイドの *latifolin* からメチル化およびアセチル化誘導体を調製し、これらの化学構造とその生物活性について調べた。

抗蟻活性については、殺蟻活性は *latifolin* と比べて 5 位がメチル化された 5-*O*-methyl*latifolin* の活性は変わらなかったが、2'位がメチル化された 2'-*O*-methyl*latifolin*, 5, 2'位がメチル化された *latifolin dimethyl ether*, 5, 2'位がアセチル化された *latifolin diacetate* の活性は 2 倍に増加し、5 位の -OH 基がより殺蟻活性に関与していた。摂食量は、*latifolin* と比べて 5-*O*-methyl*latifolin*, *latifolin dimethyl ether*, *latifolin diacetate* は 3 倍を示し、2'-*O*-methyl*latifolin* は 2 倍を示した。やはり 5 位の -OH 基がより摂食阻害活性に関与していた。また、*latifolin dimethyl ether* と *latifolin diacetate* の摂食量に増加がみられるにも関わらず、殺蟻活性は試験開始から 7 日目まで低い値を示し、その後増加することが観察された。これは、これらの誘導体が、シロアリ体内で再び活性化すると推測された。抗菌活性については、*latifolin* は木材腐朽菌(白色・褐色腐朽菌)に対して高い活性を示していたが、2'-*O*-methyl*latifolin*, 5-*O*-methyl*latifolin*, *latifolin dimethyl ether*, *latifolin diacetate* などのすべての誘導体では活性が認められなくなった。したがって、5 位と 2'位の -OH 基が *latifolin* の高い活性に関与していた。

これらの結果から、抗蟻活性(殺蟻活性・摂食阻害活性)に対しては、A 環の 5 位の -OH 基が作用しており、木材腐朽菌への抗菌活性に対しては、A, B 環の 5 位と 2'位の両方の -OH 基が作用していると考えられた。



latifolin (**1**) : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$

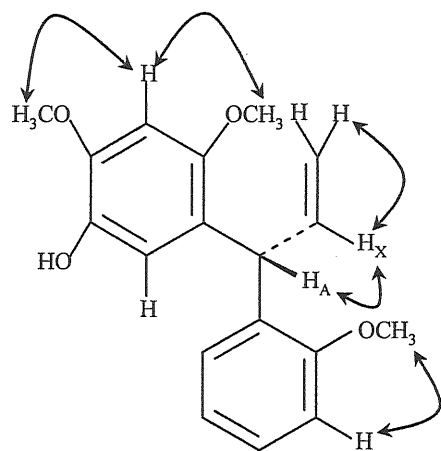
2'-*O*-methyllatifolin (**2**) : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$

5-*O*-methyllatifolin (**3**) : $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$

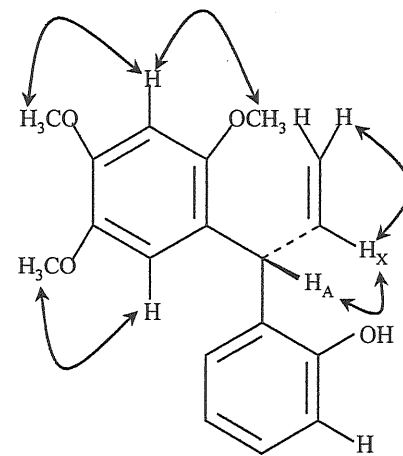
latifolin dimethyl ether (**4**) : $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OMe}$

latifolin diacetate (**5**) : $R_1 = \text{OAc}$, $R_2 = \text{OAc}$

Figure 3.1. Chemical structures of latifolin and its derivatives



2'-*O*-methylatifolin (2)



5-*O*-methylatifolin (3)

Figure 3.2. The NOESY correlations of 2'-*O*-methylatifolin and 5-*O*-methylatifolin

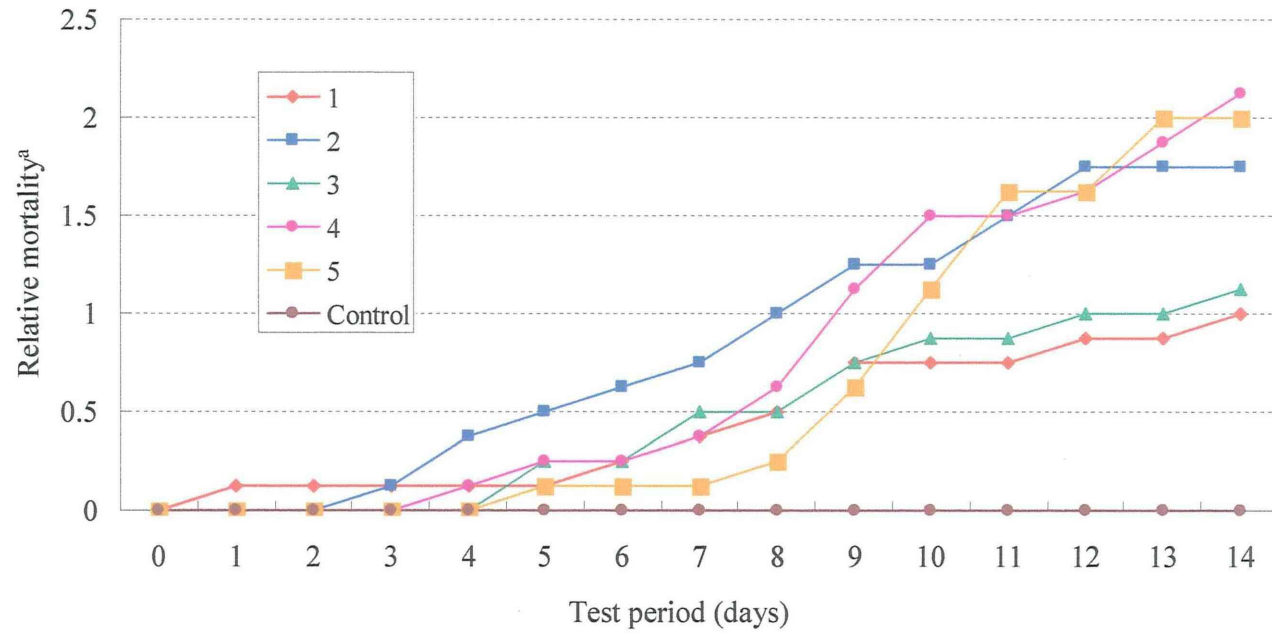


Figure 3.3. Termite mortality rate of latifolin and its derivatives

^aMortality rate (%) = number of dead termites after 14 days of the tests / number of initial termites of the tests \times 100,

Relative Mortality = mortality rate of each sample (%) / mortality rate of latifolin (%) \times 100

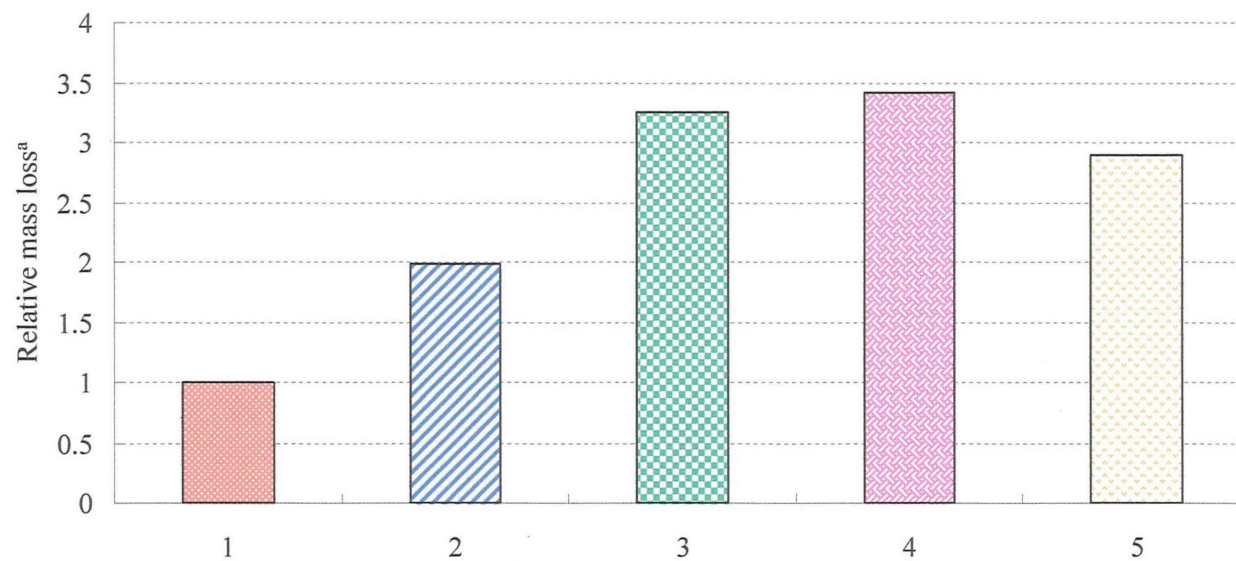


Figure 3.4. Mass loss of latifolin and its derivatives

^aMass loss (%) = weight of paper disc after 14 days of the tests (mg) / weight of initial paper disc of the tests (mg) × 100,

Relative mass loss = mass loss of each sample (%) / mass loss of latifolin (%) × 100

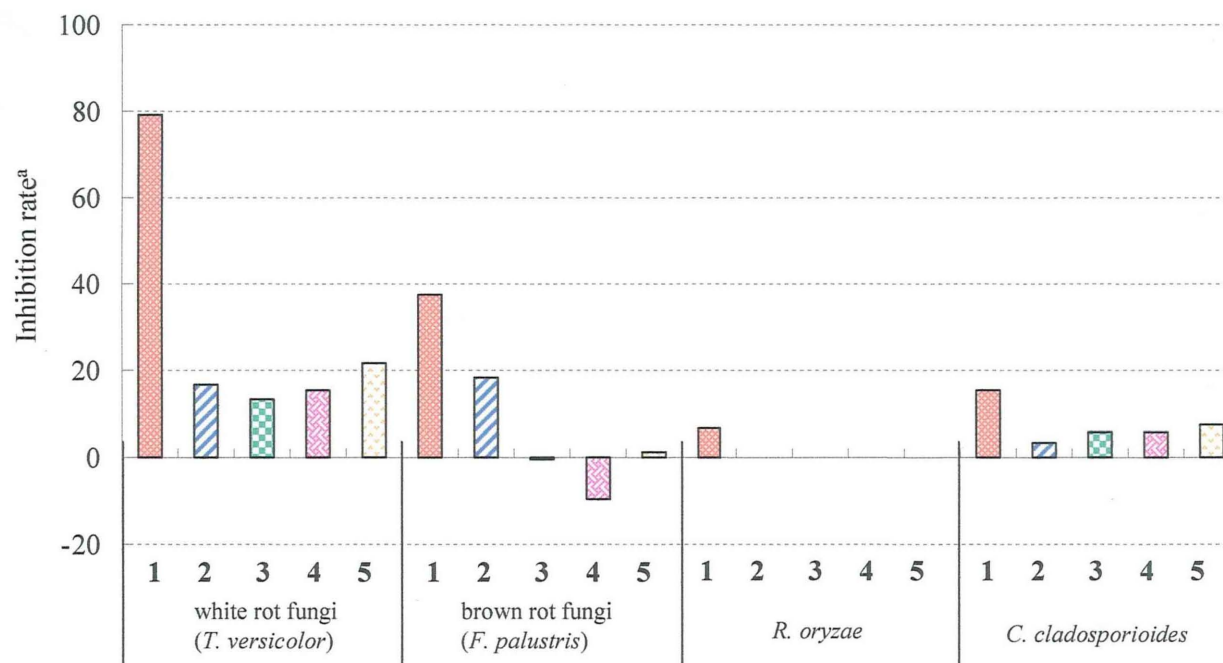


Figure 3.5. Antifungal activity of latifolin and its derivatives

^aGrowth rate (%) = mycelial growth in diameter of each sample (mm) / mycelial growth in diameter of control (mm) × 100,
 Inhibition rate (%) = 100 - growth rate (%)

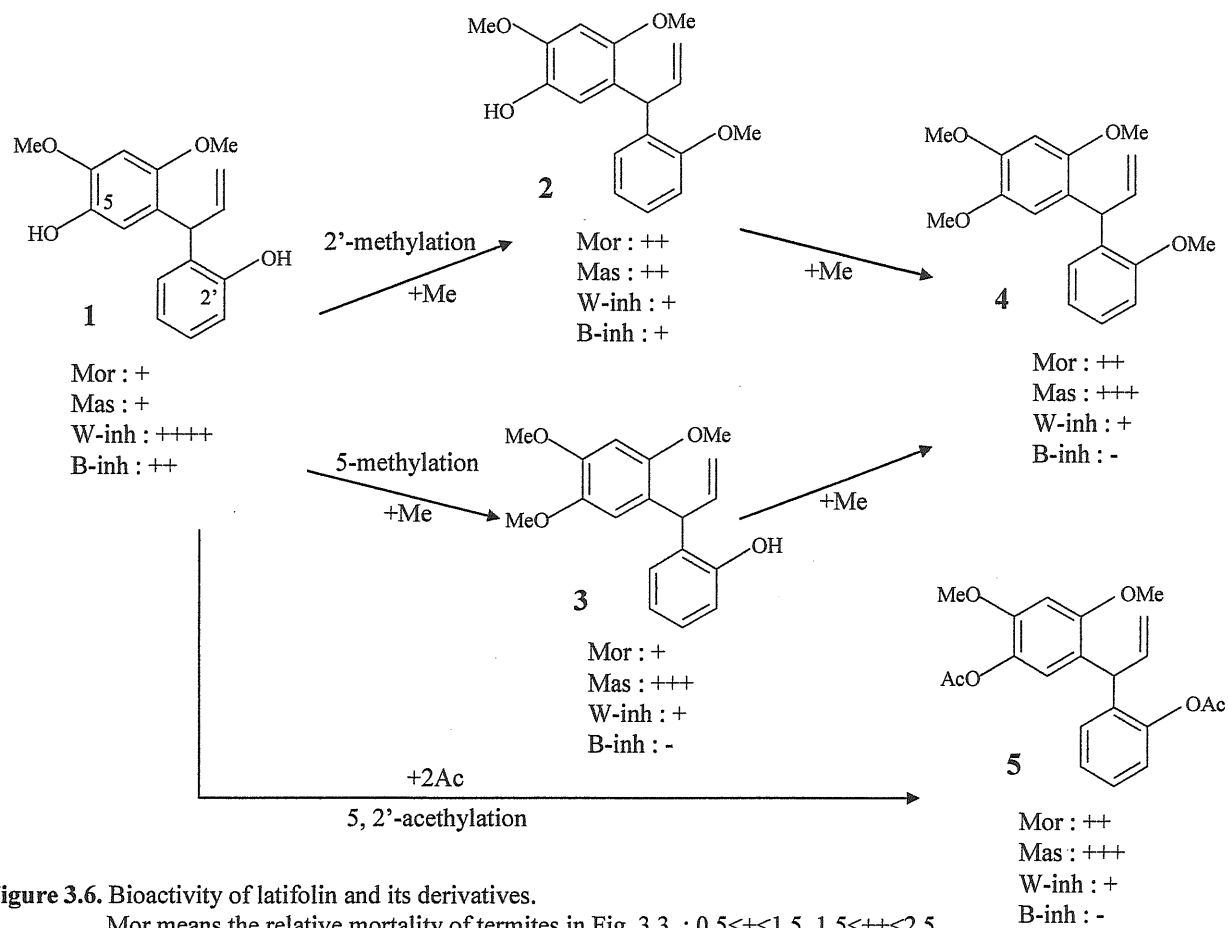


Figure 3.6. Bioactivity of latifolin and its derivatives.

Mor means the relative mortality of termites in Fig. 3.3. : $0.5 < + < 1.5$, $1.5 < ++ < 2.5$,
 Mas means the relative mass loss of termites in Fig. 3.4. : < 1.5 , $1.5 < ++ < 2.5$, $2.5 < +++$,
 W-inh and B-inh mean the inhibition rates of white-rot and brown-rot fungi in Fig. 3.5. :
 $10.0 < + < 30.0(\%)$, $30.0 < ++ < 50.0(\%)$, $50.0 < +++ < 70.0(\%)$, $70.0(\%) < ++++$

Table 3.1. Statistical analysis of bioactivity of latifolin and its derivatives

			Compounds ^a				
			1	2	3	4	5
Termite	Mortality	% mortality (mean \pm S.D.)	26.7 \pm 13.7 A	46.7 \pm 13.7 B	30.0 \pm 8.9 A	56.7 \pm 18.6 B	53.3 \pm 5.2 B
	Mass loss	mass loss of paper disc (mg \pm S.D.)	0.39 \pm 0.13 A	0.82 \pm 0.14 B	1.29 \pm 0.14 C	1.27 \pm 0.24 C	1.13 \pm 0.08 C
Fungus	<i>T. versicolor</i>	growth in diameter (mm \pm S.D.)	15.0 \pm 4.1 A	60.0 \pm 1.3 BC	62.3 \pm 2.5 C	60.8 \pm 1.2 C	56.2 \pm 5.4 B
	<i>F. palustris</i>		32.5 \pm 5.3 A	42.5 \pm 1.7 B	52.3 \pm 0.96 C	57.0 \pm 5.9 C	51.3 \pm 2.5 C
	<i>R. oryzae</i>		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	<i>C. cladosporioides</i>		26.2 \pm 2.6 A	30.0 \pm 0.89 B	29.2 \pm 1.2 B	29.3 \pm 2.2 B	28.7 \pm 0.52 B

Note : ^aThe same letter are not significantly different ; LSD, $p < 0.05.$, n.s. = not significant

第4章 酢酸エチル抽出物中の着色物質の生物活性

第1節 緒言

これまで木材の材色形成には、心材成分が関連するとされ、多くの樹種で心材化に伴い形成された低分子のフェノール性成分が前駆体となり、これらが酸化重合して高分子の着色化合物に変化し材色形成していると考えられている(60)。

特に、スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)の材色については詳しく研究されており、ノルリグナン型フェノール性成分(norlignan 類)の sugiresinol, hydroxysugiresinol, agatharesinol, sequilin-C が前駆体となり形成されるものとされている(61-63)。そのため、*D. latifolia* の心材色もまた抽出成分が関係するものと考えられる。

また、緒論で述べたように、*D. latifolia* においても心材成分として多数のフェノール性成分であるネオフラボノイドの存在が確認されており、それらが材色に関係することが考えられる。

これまで、上記のように材色の形成と着色高分子化合物との関係については論じられているが、生物活性との関係についてはほとんど論じられておらず、この関係を明らかにすることは有意義である。

第2章、第3章では抽出成分の生物活性を検討し、latifolin などのネオフラボノイドが活性を示すことを明らかにした。ところが、これら低分子化合物から形成されたと考えられる材色を構成する着色高分子化合物が酢酸エチル抽出物中に量的に多く存在することも確認された。この高分子化合物については、構造および生物活性も明らかではない。

そこで、酢酸エチル抽出物にみられた着色物質の生物活性とその性状を明らかにすることを試みた。

第 2 節 実験方法

2.1 供試材

第 2 章の 2.1 の実験方法に準じた。

2.2 着色物質の分離

心材酢酸エチル抽出物を酢酸エチルで分配抽出した後，可溶部と不溶部とに分離した(Figure 4.1)。この操作を 3 回繰り返した。得られた不溶部は GC/MS(分析条件は第 3 章と同様)で latifolin を含んでいないことを確認し，これを着色物質とした。

2.3 着色物質の分析

着色物質は UV-Vis 分析，Py(熱分解)-GC/MS，GPC(ゲルろ過クロマトグラフイー)に供してその性状を調べた。それぞれの分析条件は以下の通りである。

UV-Vis：測定溶剤 EtOH，測定波長 200～800 nm，Py(熱分解)-GC/MS：熱分解装置にはキュリーポイントインジェクター(ポータブルパイロライザー) JCI-22 (日本分析工業)を用いた。熱分解の際，メチル化は Tetramethylammonium hydroxide pentahydrate 25% MeOH 溶液を用いた。パイロホイル(キュリー点 500 °C)で 5 秒熱分解し，GC/MS に注入した。GC/MS 分析機器および条件などは以下の通りである。GLC/MS には SHIMADZU QP-5000 を使い，DB-1(30 m×0.32 mm i.d.; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)カラムを使用した。分析条件は，カラム温度は，50°C で 1 分保持した後，5°C/min 昇温させ，320°C で 5 分保持とした。インジェクターの温度は 250°C，ディテクターの温度は 250°C，測定質量範囲は 50-450 とし，キャリアーガスには He(2.6 ml/min)を用いた。GPC：カラム：Waters, Ultrastyrigel Plus LMW 100 Å+500 Å，流速：1.0ml/min，移動相：THF，標品：Polystyrene Shodex Standard SL-105, S-0.5, S-0.9, S-1.3, S-1.9，測定波長 254 nm，標品 polystyrene の分析から，これらの分子量の対数と溶出量は直線関係にあるため，各 polystyrene による検量線

($y=-0.2507x+6.8877$, $R^2=0.9992$)を作成した(**Figure 4.2**)。

2.4 抗蟻試験

2.4.1 供試シロアリ

第2章の2.4.1の実験方法に準じた。採取時期は2008年5月とした。

2.4.2 殺蟻試験・摂食阻害試験

第2章の2.4.2の実験方法に準じた。

2.5 抗菌試験

2.5.1 供試菌

第2章の2.5.1の実験方法に準じた。

2.5.2 試験方法

第2章の2.5.2の実験方法に準じた。

第 3 節 結果および考察

3.1 着色物質の性状

UV-Vis 分析では，着色物質は可視領域に特徴的な 560nm を最大値とした 400 ~ 700nm に吸収がみられ，latifolin や MeOH 抽出物のそれとは明らかに異なっていた (Figure 4.3)。

Py-GC/MS 分析では，着色物質の熱分解物が認められた (Figure 4.4)。このガスクロマトグラム中には latifolin と同一の t_R にピークが確認され，そのマススペクトルの一致も確認した。そのため，着色物質に latifolin の構造体が存在することが示唆された (Figure 4.4)。着色物質の GPC 分析では，標品の検量線から着色物質の GPC により認められた Peak 1 と Peak 2 の分子量は，それぞれ約 1400, 700 付近であると推測した (Figure 4.2, 4.5)。

これまで，*Dalbergia* 属の着色物質については，*D. condensatensis* や *D. congestiflora* から candenatone, neocandenatone などの紫色 dimer が報告されている (17, 18)。しかし，生物活性との関係については明らかにされていない。

D. latifolia の着色物質は，UV-Vis 分析では可視領域の 560nm 付近に特徴的な最大吸収が認められたこと，Py-GC/MS 分析では着色物質の構造体の 1 つとして latifolin が存在すること，GPC 分析では着色物質は 700 付近および 1400 付近の分子量分布を示すことなどから，この着色物質は latifolin 関連の 2 量体以上の重合体であると推測された。

3.2 着色物質の生物活性

着色物質に対するシロアリと木材腐朽菌およびカビ類に対する生物活性を調べた (Table 4.1)。着色物質の殺蟻・摂食阻害活性は，第 2 章で単離した成分と比べて殺蟻活性は低く，摂食阻害活性も認められなかった。

また，着色物質の抗菌活性は，白色腐朽菌と褐色腐朽菌のいずれの木材腐朽菌に対しても活性は認められなかった。*R. oryzae* と *C. cladosporioides* のいずれ

のカビ類に対しても活性は認められなかった。

重合体の抗菌活性については，加水分解型タンニンが木材腐朽菌に対する活性が報告されているだけである(41)。

着色物質の生物活性は，抗蟻活性(殺蟻活性・摂食阻害活性)もいずれの菌(白色腐朽菌，褐色腐朽菌，*R. oryzae*，*C. cladosporioides*)に対する抗菌活性も低い活性を示すことから，生物に対する防御作用の役割は低いことが示された。

着色物質の性状と生物活性を明らかにすることにより，latifolinなどのネオフラボノイドが重合すると生物活性が低くなることが推測された。

第 4 節 小括

酢酸エチル抽出物の着色物質の生物活性とその性状を調べた。

まず、着色物質の性状を明らかにするため、UV-Vis、Py-GC/MS、GPC 分析をおこなった。着色物質は紫色を呈し、UV-Vis 分析では可視領域の 560nm 付近に特徴的な吸収が認められた。Py-GC/MS 分析では着色物質の構造体の 1 つとして latifolin が認められた。また、GPC 分析では着色物質は 700 付近および 1400 付近の分子量分布を示した。これらのことから、着色物質は latifolin 関連の重合体であると推測された。

次に、生物活性について検討した。抗蟻・抗菌活性のいずれも低いことを明らかにした。

以上のことから、着色物質の性状と生物活性を検討することにより、latifolin などのネオフラボノイドの重合は、それらの生物活性を低下させると推測された。

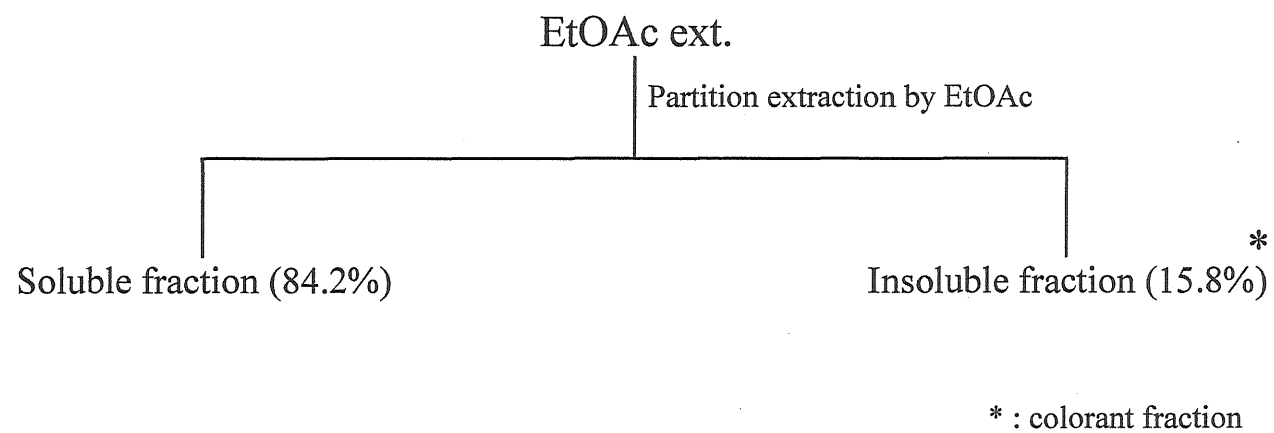


Figure 4.1. Isolation scheme of colorant

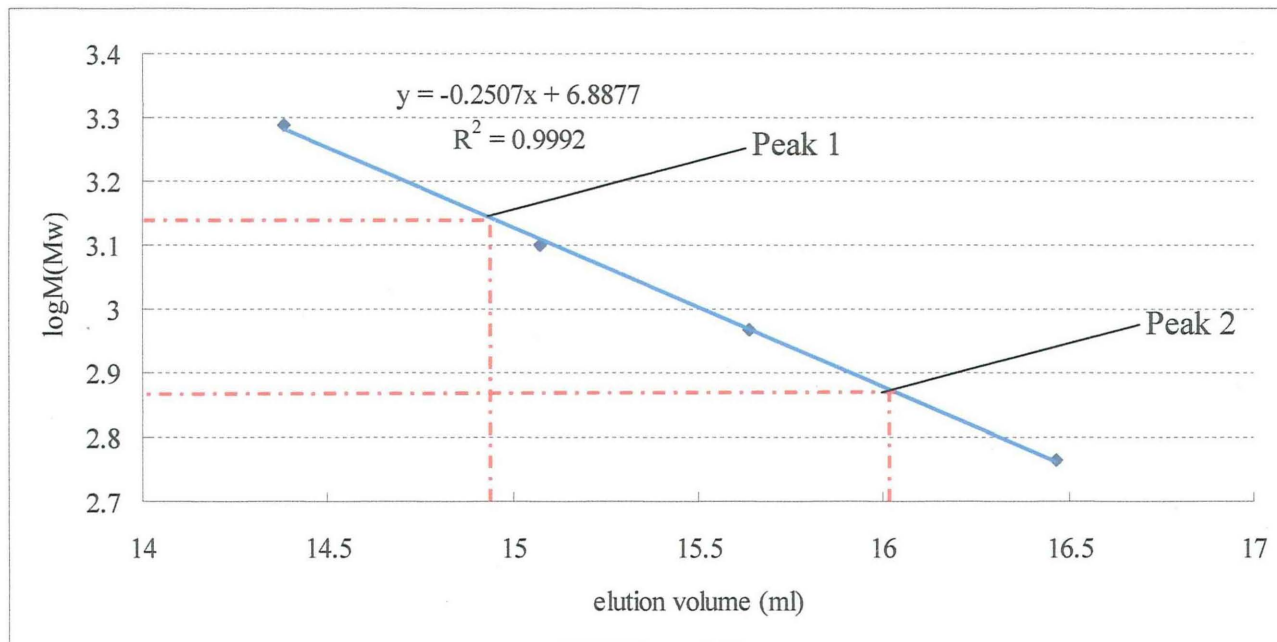


Figure 4.2. Calculation line from GPC of polystyrene

Note : Peak 1 and peak 2 are from GPC of colorant

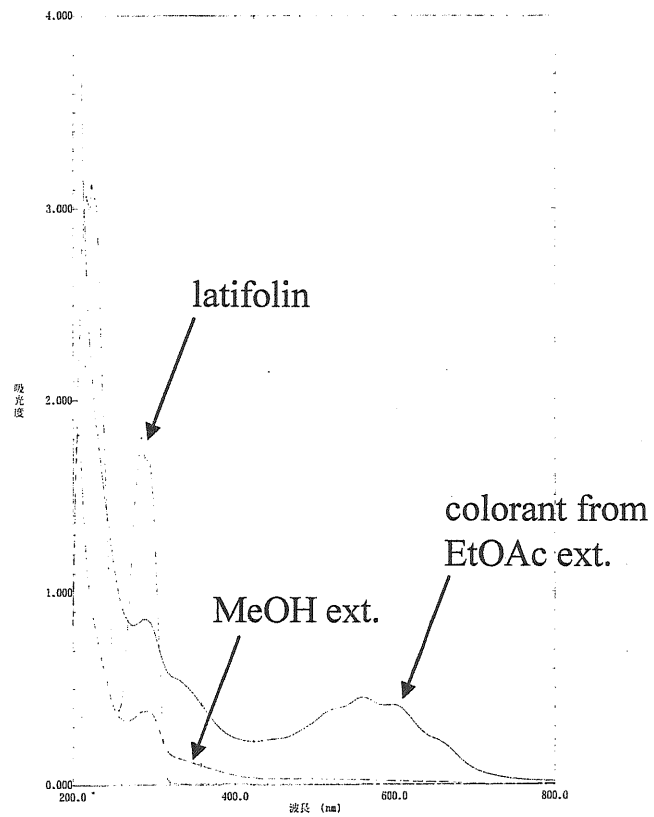


Figure 4.3. UV-Vis spectra of colorant from EtOAc ext.

Note : Solvent (EtOH), wave range 200~800 nm

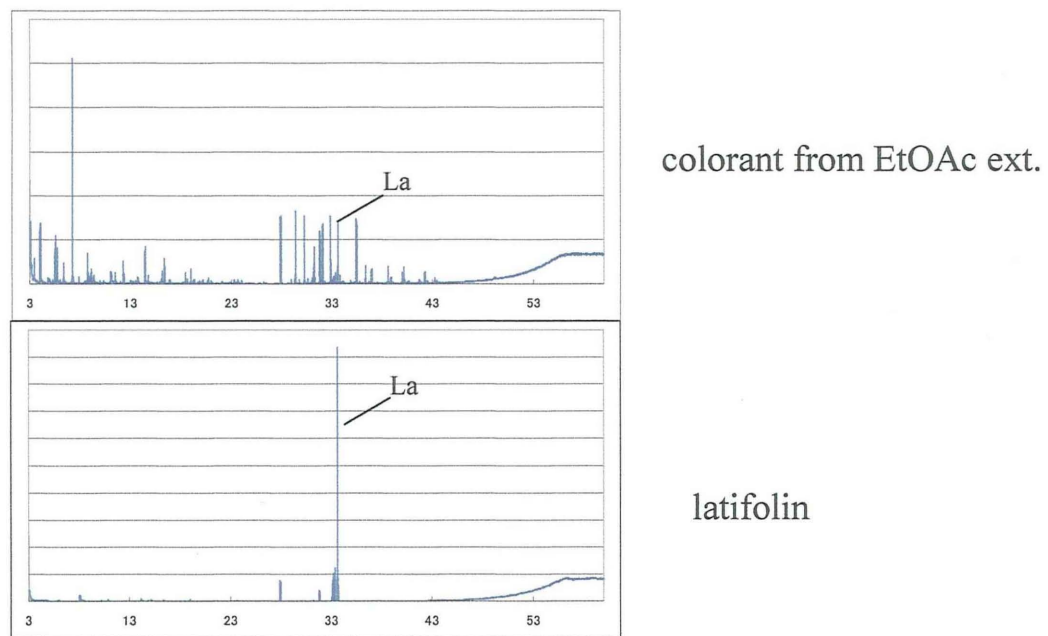


Figure 4.4. TMAH thermochemolysis-GC/MS trace of colorant from EtOAc ext. and latifolin.

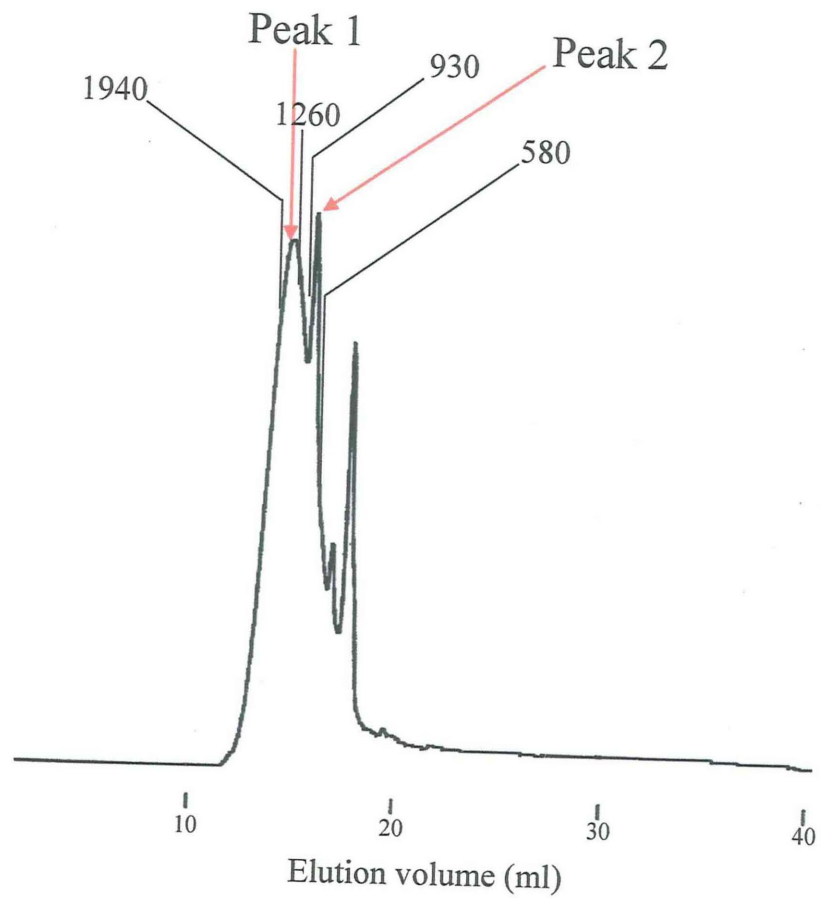


Figure 4.5. GPC of colorant

Table 4.1. Bioactivity of colorant from EtOAc extract of *D. latifolia* heartwood.

		colorant	La	Blank	
Termite ¹⁾	mortality	dead numbers (n=30)	5	21	4
		mortality (%)	16.7	70.0	13.3
	antifeedant	mass loss of paper disc (mg)	3.7	0.0	4.9
		mass loss (%)	13.0	0.0	17.3
relative mass loss (%)		75.2	0.1	100.0	
Fungus ²⁾	white rot fungi (<i>T. versicolor</i>)	growth in diameter (mm)	84.0	39.3	75.5
		growth rate (%)	111.3	52.0	100.0
		inhibition rate (%)	-11.3	48.0	0.0
	brown rot fungi (<i>F. palustris</i>)	growth in diameter (mm)	49.3	50.6	55.6
		growth rate (%)	88.7	91.0	100.0
		inhibition rate (%)	11.3	9.0	0.0
	<i>R. oryzae</i>	growth in diameter (mm)	84.0	80.7	84.0
		growth rate (%)	100.0	96.0	100.0
		inhibition rate (%)	0.0	4.0	0.0
	<i>C. cladosporioides</i>	growth in diameter (mm)	33.8	29.0	33.3
		growth rate (%)	101.8	87.2	100.0
		inhibition rate (%)	-1.8	12.8	0.0

Note : ¹⁾Test samples were treated with 3% (w/w) of paper disc weight (mg).

²⁾Test samples were treated and spread on surface of PGA medium in 5.0 μ g/cm²

第 5 章 総括

Dalbergia latifolia は、日本では紫檀と呼ばれ、紫色の有用銘木である。耐朽性にも優れていることから様々な用途に用いられている。また、*D. latifolia* の心材には開環型ネオフラボノイドなどの特徴的な成分が存在することが知られている。しかし、その生物活性に関する研究はあまりおこなわれていない。本研究は、*D. latifolia* 心材抽出成分の抗蟻・抗菌活性について研究をおこなったものである。得られた結果および考察は以下の通りである。

第 2 章では、*D. latifolia* 心材抽出物と単離成分の抗蟻・抗菌活性を調べた。心材のヘキササン・酢酸エチル抽出物に、顕著な殺蟻・摂食阻害活性と木材腐朽菌に対する抗菌活性を見だし、主要成分である開環型ネオフラボノイドの latifolin, dalbergiphenol, 4-methoxydalbergione を活性成分として単離・同定した。その 3 成分の中では、含有量は latifolin が最も高く、続いて 4-methoxydalbergione, dalbergiphenol の順となった。生物活性においては、latifolin に高い殺蟻・摂食阻害活性とカワラタケ (*Trametes versicolor*) に対する高い抗菌活性を確認した。Dalbergiphenol ではシロアリへの摂食阻害活性、オオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*), *Rhizopus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides* に対する高い抗菌活性を確認した。4-Methoxydalbergione は摂食阻害活性とカワラタケに対する抗菌活性を確認した。それらの構造を比較すると B 環オルト位の -OH 基の有無および A 環のキノン構造の存在が生物活性発現の特異性に影響を及ぼしていた。このように、*D. latifolia* は心材抽出成分の多様化およびネオフラボノイドの部分構造の変化によって生物に対する多様な防御作用を生み出していると推測した。

第 3 章では、*D. latifolia* 心材の主要成分であり、高い生物活性を示した latifolin およびそのメチル化・アセチル化誘導体を調製し、これらの化学構造と生物活性の関係について調べた。抗蟻活性については、殺蟻活性は latifolin

と比べて 5 位がメチル化された 5-*O*-methylatifolin の活性は変わらなかったが、2'位がメチル化された 2'-*O*-methylatifolin, 5, 2'位がメチル化された latifolin dimethyl ether, 5, 2'位がアセチル化された latifolin diacetate の活性は 2 倍に増加し、5 位の -OH 基がより殺蟻活性に関与していた。摂食量は、latifolin と比べて 5-*O*-methylatifolin, latifolin dimethyl ether, latifolin diacetate は 3 倍を示し、2'-*O*-methylatifolin は 2 倍を示した。やはり 5 位の -OH 基がより摂食阻害活性に関与していた。また、latifolin dimethyl ether と latifolin diacetate の摂食量に増加がみられるにも関わらず、殺蟻活性では試験開始から 7 日目まで低い値を示し、その後増加することが観察した。これは、これらの誘導体が、シロアリ体内で再び活性化すると推測された。抗菌活性については、latifolin は木材腐朽菌(白色・褐色腐朽菌)に対して高い活性を示していたが、2'-*O*-methylatifolin, 5-*O*-methylatifolin, latifolin dimethyl ether, latifolin diacetate などのすべての誘導体では活性が認められなくなった。したがって、5 位と 2'位の -OH 基が latifolin の高い活性に関与していた。これらの結果から、抗蟻活性(殺蟻活性・摂食阻害活性)に対しては、A 環の 5 位の -OH 基が作用しており、木材腐朽菌への抗菌活性に対しては、A, B 環の 5 位と 2'位の両方の -OH 基が作用していると考えた。

第 4 章では、酢酸エチル抽出物の着色物質の生物活性とその性状を調べた。着色物質は紫色を呈し、UV-Vis 分析では可視領域の 560nm 付近に特徴的な吸収ピークが認められた。Py-GC/MS 分析では着色物質の構造単位の 1 つとして latifolin が認められた。また、GPC 分析では着色物質は 700 付近および 1400 付近に分子量分布を示した。これらのことから、紫色を示す着色物質は latifolin 関連の重合体であると推測された。生物活性については、抗蟻・抗菌活性のいずれも低いことが示された。着色物質の性状と生物活性から、latifolin などのネオフラボノイドの重合は、それらの生物活性を低下させると推測された。

以上のことから、*D. latifolia* 心材の生物活性は、開環型ネオフラボノイドの内、latifolin が主要な活性を担っており、他のネオフラボノイドは、その構造を変化させることで多様な防御作用を生み出していることが明らかとなった。また、開環型ネオフラボノイドの化学構造と生物活性の相関について新たな知見を得ることができた。

引用文献

- 1) Hausen, B.M., 谷田貝光克訳, 竹下隆裕訳, 小林隆弘訳 : "木材の化学成分とアレルギー", 学会出版センター, 東京, 1987, pp. 119-123
- 2) Balakrishna, S., Rao, M.M., Seshadri, T.R. : *Tetrahedron*, 18 (12), 1503-1507 (1962)
- 3) Rao, M.M., Seshadri, T.R. : *Tetrahedron Letters*, No. 4, 211-215 (1963)
- 4) 大橋英雄, 北川敦士, 堀田誠司, 今村博之 : 岐阜大学農研報, No. 48, 69-77 (1983)
- 5) Syafii, W. : *Indon. J. Trop. Agric.*, 9 (3), 55-58 (2000)
- 6) Muangnoicharoen, N., Frahm, A.W. : *Phytochemistry*, 21 (3), 767-772 (1982)
- 7) Donnelly, D.M.X., Nangle, B.J., Prendergast, J.P., O'Sullivan : *Phytochemistry*, 7 (4), 647-649 (1968)
- 8) Eyton, W.B., Ollis, W.D., Sutherland, I.O., Gottlieb, O.R., Taveira Magalhaes, M., Jackman, L.M. : *Tetrahedron*, 21 (9), 2683-2696 (1965)
- 9) Eyton, W.B., Ollis, W.D., Fineberg, M., Gottlieb, O.R., Salignac De Souza Guimaraes, I., Taveira Magalhaes, M. : *Tetrahedron*, 21 (9), 2697-2705 (1965)
- 10) Barnes, M.F., Ollis, W.D., Sutherland, I.O., Gottlieb, O.R., Taveira Magalhaes, M. : *Tetrahedron*, 21 (9), 2707-2715 (1965)
- 11) Chan, S.-C., Chang, Y.-S., Kuo, S.-C. : *Phytochemistry*, 46 (5), 947-949 (1997)
- 12) Seshadri, T.R. : *Phytochemistry*, 11 (3), 881-898 (1972)
- 13) Findley, L.J. : *Brit. J. Ind. Med.*, 29 (3), 343-344 (1972)
- 14) Schulz, K.H., Garbe, I., Hausen, B.M., Simatupang, M.H. : *Arch. Derm. Res.*, 264 (3), 275-286 (1979)
- 15) Goncalves De Lima, O., Dalia Maia, M.H., D'Albuquerque, I.L., Borba, M.A. : *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife*, 3, 61 (1961)

- 16) Rosado-Vallado,M., Brito-Loeza,W., Mena-Rejo'n,G.J., Quintero-Marmol,E., Flores-Guido,J.S. : *Fitoterapia*, 71 (5), 570-573 (2000)
- 17) Barraga'n-Huerta,B.E., Peralta-Cruz,J., Gonza'lez-Laredo,R.F., Karchesy,J. : *Phytochemistry*, 65 (7), 925-928 (2004)
- 18) Hamburger,M.O., Cordell,G.A., Ruangrunsi,N., Tantivana, P. : *J. Org. Chem.*, 53 (18), 4161-4165 (1988)
- 19) 秋久俊博, 小池一男, 木島孝夫, 羽野芳生, 堀田 清, 増田和夫, 宮澤三雄, 安川 憲 : "資源天然物化学", 共立出版, 東京, 2002, pp. 124-147
- 20) Baxter,H., Harborne,J.B. : " The Handbook of Natural Flavonoids, Vols 1 & 2", John Wiley & Sons, Inc., Chichester (UK), 1999, pp 689-707
- 21) Whang,W.K., Park,H.S., Ham,I., Oh,M., Namkoong,H., Kim,H.K., Hwang,D.W., Hur,S.Y., Kim,T.E., Park,Y.G., Kim,J.-R., Kim,J.W. : *Exp Mol Med*, 37 (5), 436-446, (2005)
- 22) M'arquez,N., Sancho,R., Bedoya,L.M., Alcam'i,J., L'opez-P'erez,J.L., Feliciano,A.S., Fiebich,B. L., Mu~noz,E. : *Antiviral Res.*, 66 (2-3), 137-145, (2005)
- 23) Rojas-Hijazo,B., Lezaun,A., Hausen,B.M., Segura,N., Garce's,M., Cola's,C. : *Contact Dermatitis*, 56 (5), 274-277, (2007)
- 24) 狩野仁美, 渋谷 栄, 林 和男, 飯島泰男, 土居修一 : 木材学会誌, 50 (2), 91-98 (2004)
- 25) 小藤田久義, 藤野陽治, 佐々木達也, 長谷部真, 太田路一, 鈴木幸一 : 木材学会誌, 47 (6) 479-486, (2001)
- 26) Tellez,M.R., Ikhallas,A.K., Kobaisy,M., Schrader,K.K., Dayan,F.E., Osbrink,W.L.A. : *Phytochemistry*, 61 (2), 149-155, (2002)
- 27) Seru,G., Pannakal,S.T., Serge,F., Hartmut,L. : *Phytochemistry*, 65 (9),

- 1265-1271, (2004)
- 28) 曾我部昭好, 金城一彦, 阿部フミ子, 山内辰朗, 屋我嗣良 : 木材学会誌, 46 (2), 124-131, (2000)
- 29) Kofujita,H., Ota,M., Takahashi,K., Kawai,Y., Hayashi,Y. : *Phytochemistry*, 61 (8), 895-898, (2002)
- 30) Sandermann,W., Dietrichs,H.H. : *Holz als Roh- und Werkstoff*, 15 (7), 281-297, (1957)
- 31) 屋我嗣良 : 木材学会誌, 26 (7), 494-498, (1980)
- 32) 屋我嗣良 : 木材学会誌, 23 (11), 594-600, (1977)
- 33) 屋我嗣良, 金城一彦 : 木材学会誌, 31 (8), 684-687, (1985)
- 34) 近藤民雄, 黒鳥四朗, 手島睦子, 住本昌之 : 木材学会誌, 9 (4), 125-129, (1963)
- 35) 渡辺則利, 佐伯沙子, 住本昌之, 近藤民雄, 黒鳥四朗 : 木材学会誌, 12 (5), 236-238, (1966)
- 36) 佐伯沙子, 住本昌之, 近藤民雄 : 木材学会誌, 14 (2), 110-114, (1968)
- 37) 中島 健, 善本知孝, 福住俊郎 : 木材学会誌, 26 (10), 698-702, (1980)
- 38) 松井隆尚, 松下洋一, 菅本和寛, 小川喜八郎 : 木材学会誌, 47 (1), 58-62, (2001)
- 39) 謝 瑞忠, 住本昌之 : 木材学会誌, 38 (5), 482-489, (1992)
- 40) 金城一彦, 屋我嗣良 : 木材学会誌, 32 (8), 632-636, (1986)
- 41) 岸野正典, 大井 洋, 山口 彰 : 木材学会誌, 41 (4), 444-447, (1995)
- 42) Carmel,A.P., 近藤隆一郎, 清水邦義, 坂井克己 : 木材学会誌, 41 (6), 593-597, (1995)
- 43) 浅田隆之, 石本登志, 酒井 明, 角谷和男 : 木材学会誌, 35 (9), 851-855, (1989)

- 44) 近藤隆一郎, 今村博之 : 木材学会誌, 32 (3), 213-217, (1986)
- 45) 善本知孝, 鮫島正浩, 木村友昭, 吉富清志, 中西清人, 森 寛一 : 木材学会誌, 30 (3), 244-250, (1984)
- 46) 伊藤由紀子, 林 良興, 加藤 厚 : 木材学会誌, 41 (7), 694-698, (1995)
- 47) 尾形啓明, 荻山紘一 : 木材学会誌, 46 (1), 54-62, (2000)
- 48) 谷田貝光克, 佐藤敏弥, 山口雄三, 高橋利夫 : 木材学会誌, 30 (3), 240-243, (1984)
- 49) 関根伸浩, 芦谷竜矢, 村山哲也, 荻山紘一, 高橋孝悦 : 木材学会誌, 55 (1), 29-36, (2009)
- 50) Kobaisy, M., Cantrell, C.L., Mims, A.B., Lax, A.R., Tellez, M.R., Osbrink, W.L.A. : *J. Agri. Food Chem.*, 56 (11), 4021-4026, (2008)
- 51) Cantrell, C.L., Duke, S.O., Fronczek, F.R., Osbrink, W.L.A., Mamonov, L.K., Vassilyev, J.I., Wedge, D.E., Dayan, F.E. : *J. Agric. Food Chem.*, 55 (26), 10656-10663, (2007)
- 52) Shibutani, S., Samejima, M., Doi, S. : *J. Wood. Sci.*, 50 (5), 439-444, (2004)
- 53) Ishida, M., Serit, M., Nakata, K., Juneja, L.R., Kim, M., Takahashi, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (11), 1835-1838, (1992)
- 54) Ohmura, W., Doi, S., Aoyama, M. : *J. Wood. Sci.*, 46 (2), 149-153, (2000)
- 55) Hattori, S. : *Microbes Environ.*, 23 (2), 118-127, (2008)
- 56) Kane, M.D., Breznak, J.A. : *Arch. Microbiol.*, 156 (2), 91-98, (1991)
- 57) Brune, A., Miambi, E., Breznak, J.A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (7), 2688-2695, (1995)
- 58) Schultz, T.P., Hubbard, T.F., Jin, Jr, L., Fisher, T.H., Nicholas, D.D. : *Phytochemistry*, 29 (5), 1501-1507, (1990)
- 59) Schultz, T.P., Cheng, Q., Boldin, W.D., Hubbard, T.F., Jin, Jr, L., Fisher, T.H.,

Nicholas,D.D. : *Phytochemistry*, 30 (9), 2939-2945, (1991)

- 60) 今村博之, 安江保民, 岡本 一, 横田徳郎, 後藤輝男, 善本知孝 : "木材利用の化学", 共立出版, 東京, 1983, pp. 204-214
- 61) 高橋孝悦 : 木材学会誌, 42 (10), 998-1005, (1996)
- 62) 高橋孝悦 : 木材学会誌, 44 (2), 125-133, (1996)
- 63) Takahashi,K., Mori,K. : *J. Wood. Sci.*, 52 (2), 134-139, (2006)

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始，ご指導，ご鞭撻を賜った山形大学農学部生物環境学科 高橋孝悦教授，荻山紘一教授，芦谷竜矢准教授，生物資源学科 貫名学教授，岩手大学農学部共生環境課程 小藤田久義准教授に深謝の意を表します。

更に，山形大学農学部生物資源学科 村山哲也教授，並びに秋田県立大学木材高度加工研究所 澁谷栄准教授には NMR スペクトルの測定，並びに帰属に対するご指導を賜りました。更に，山形大学農学部生物資源学科 服部聡助教にはシロアリの生態，並びに代謝に関してご指導を賜りました。記して，深謝いたします。

最後に，実験の遂行，並びに論文執筆にあたり多大な協力と激励をいただいた，山形大学農学部生物環境学科森林資源学講座(森林資源利用学研究室)の諸氏に感謝いたします。

Summary

Dalbergia latifolia is one of the important tropical woods, and well known for beautiful purple color in heartwood. The wood is superior in durability, consequently it is utilized in various products. It was reported that the heartwood of *D. latifolia* contain typical components of open type neoflavonoids. The bioactivities of the neoflavonoids have been investigated to a lesser extent.

In the second chapter, the heartwood of *D. latifolia* was extracted succesively with *n*-hexane, EtOAc and MeOH solvent. The extracts were then examined for the bioactivity against termites and various fungi, including non-wood decay fungi. The quantity and quality of bioactive components of the extracts were also examined. The *n*-hexane extract was proved to be the most active fraction against termites (mortality and antifeedant) and wood decay fungi. As the main compounds of the extract, latifolin, dalbergiphenol and 4-methoxydalbergione were isolated and identified as the bioactive components, and they all belonged to the neoflavonoids. Of the three isolated compounds, the relative content level of latifolin was the highest, followed by 4-methoxydalbergione, and dalbergiphenol, respectively. With regard to bioactivity, latifolin showed relatively high termiticidal, termite-antifeedant and antifungal activity against Kawaratake (*Trametes versicolor*). Dalbergiphenol exhibited moderate termite-antifeedant activity and relatively high antifungal activity against Oouzuratake (*Fomitoposis palustris*), *Rhizopus oryzae* and *Cladosporium cladosporioides*. 4-Methoxydalbergione showed moderately termite-antifeedant activity and antifungal activity against Kawaratake. By comparing the structure of these compounds, the specific performance in bioactivity corresponded to the existence of hydroxyl in the ortho position in B ring

and to the quinonoid structure in A ring. Thus, it was suggested that the major defensive actions against various organisms in *D. latifolia* was partly due to variation of the heartwood extracts and the changing partial structure of neoflavonoids.

In the third chapter, latifolin showed the highest content level in *n*-hexane and EtOAc extracts, and exhibited high anti-termite and anti-fungal activity levels. Latifolin and its derivatives, which were methylated and acetylated, were investigated with the aim of confirming the correlation between bioactivity (anti-termite and anti-fungal activity) and chemical structure. In assessing the anti-termite activity of latifolin and its derivatives, termite mortality in response to the derivatives 2'-*O*-methylatifolin, latifolin dimethyl ether and latifolin diacetate increased two-fold compared with latifolin, mortality rate from 5-*O*-methylatifolin was not different from latifolin. It was observed that the termite mortality were correlated to the hydroxyl group at C-5 of the A-ring than to the hydroxyl group at C-2' of the B-ring. Termite mass loss, due to termite exposure, in response to 5-*O*-methylatifolin, latifolin dimethyl ether and latifolin diacetate was three-times greater than latifolin, and the mass loss from 2'-*O*-methylatifolin was twice as great as latifolin. Furthermore, the mass loss were correlated to the hydroxyl group at C-5 of the A-ring than to the hydroxyl group at C-2' of the B-ring. The mortality rate from latifolin dimethyl ether and latifolin diacetate was low until 7 days after initial exposure, and then increased sharply until the end of observation. In assessing the anti-fungal activity of these compounds, latifolin showed high activity level, however the derivatives, 2'-*O*-methylatifolin, 5-*O*-methylatifolin, latifolin dimethyl ether and latifolin diacetate, exhibited lower levels than that of latifolin. It was also found that anti-fungal activity against white-rot and brown-rot fungi were

correlated to both C-5 and C-2' hydroxyl groups in the A and B-rings. Our findings indicate that the hydroxyl group at C-5 of the A-ring provides anti-termite activities (mortality and mass loss). In addition, both C-5 and C-2' hydroxyl groups in the A and B-rings have anti-fungal activity against white-rot and brown-rot fungi. In conclusion, the bioactivity of latifolin depends on the position of hydroxyl groups.

In the fourth chapter, it was investigated for compositions and their bioactivities of the colorant fraction, purple pigment, from EtOAc extract. UV-Vis spectra of colorant fraction showed a maximum absorption at 560 nm. Chromatogram and MS spectrum obtained from Py-GC/MS analysis of colorant fraction indicated that the fraction was contained latifolin as one of the constituents. It was suggested from GPC analysis that the molecular weight distribution of colorant fraction had range from 700 to 1400. From above results, the purple colorant fraction contained polymerized latifolin and its related compounds. In bioactivities, the anti-termite and anti-fungal activity of colorant fraction exhibited low activity levels in response to those of latifolin. In relating quality and bioactivity of colorant fraction, it was assumed that the polymerization of latifolin and other neoflavonoids caused the decline of bioactivities.

As conclusions, in assessing the bioactivity of *D. latifolia* heartwood, considerable defensive actions against various organisms were performed by open type neoflavonoids which was represented by latifolin. Thus, remarkable knowledge about the correlation between bioactivity and chemical structure of open type neoflavonoids were obtained by these studies.

本研究に関する報告一覧

- 1) 関根伸浩, 芦谷竜矢, 村山哲也, 荻山絃一, 高橋孝悦 : *Dalbergia latifolia* 心材の生物活性抽出成分, 木材学会誌, 55 (1), 29-36, (2009)

- 2) Nobuhiro Sekine, Tatsuya Ashitani, Tetsuya Murayama, Sakae Shibutani, Satoshi Hattori, Koetsu Takahashi : Bioactivity of latifolin and its derivatives against termites and fungi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (submit in November 2008)

以上