報 文

[Nippon Nôgeikagaku Kaishi Vol. 75, No. 6, pp. 659~667, 2001]

オノエヤナギの主要な抗菌物質 Ampelopsin とそのメチル化物

松本剛史*, 田原哲士**

(*北海道大学大学院農学研究科, **CREST, 科学技術振興事業団)

(平成 13 年 1 月 12 日受理)

Ampelopsin, a Major Antifungal Constituent from *Salix sachalinensis*, and its Methyl Ethers

Takeshi MATSUMOTO* and Satoshi TAHARA**

*Laboratory of Ecological Chemistry, Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture,
Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

**CREST, Japan Science and Technology Corporation

To measure the antifungal potency of plant secondary metabolites, we did an antifungal test using *Cladosporium herbarum* as a test fungus and minute extracts of some plants. This test showed that the methanol extract of *Salix sachalinensis* leaves had strong antifungal activity. An antifungal principle in the leaves has been identified as (2*R*, 3*R*)-(+)-5,7,3',4',5'-pentahydroxy-dihydroflavonol (ampelopsin). The antifungal potency of *S. sachalinensis* leaves was not due to an antifungal constituent with high specific activity, but due to the high content of ampelopsin. To improve the antifungal activity, ampelopsin was made into variously methylated derivatives, and these products were bioassayed. 7,3',4'-Tri-*O*-methylampelopsin, out of 8 derivatives, had the strongest antifungal activity, which was about 4 times that of ampelopsin. The structure-activity relationship is briefly discussed.

(Received January 12, 2001)

Key words: *Salix sachalinensis*; Salicaceae; antifungal compound; ampelopsin; dihydroflavonol

緒 言

自ら移動することができない植物は、植物病原菌や植食性動物などの外敵から自分自身を防御するために物理的あるいは化学的障壁を備えており、それらが安定した生態系の形成に大きな要因になっているものと考えられる。その中で植物由来の抗菌性物質は化学的障壁の一つであり、Ingham はそれらの分類と定義を提唱した⁽¹⁾。感染前抗菌物質として prohibitin (構成的抗菌物質で防御機能を果たし、感染による保持量は感染によって変化しないもの) と inhibitin (感染前には少量であるが感染刺激によってその量を増加させ防御能を果たすもの) の二つ、また感染後抗菌物質として post-inhibitin (抗菌活性をもたない前駆体が感染刺激によって抗菌活性本体に変換されるもの) と phytoalexin (感染刺激や傷害によって新たに生成

され防御機能を果たすもの) とに分類した。

高等植物の抗菌物質は、植物二次代謝産物と呼ばれる化合物群に属し、植物二次代謝産物はそれぞれの植物に特徴的な化合物群を形成する。本研究で用いたヤナギ科植物に含まれる代表的な二次代謝産物はフェノール性物質である。その中でも最も有名かつ広くヤナギ科植物に分布しているものは salicin あるいはその関連化合物である⁽²⁾。

身近な植物を実験材料に葉の粗抽出物を抗菌活性試験に供し、植物に含まれる防御物質を抗菌活性を指標にスクリーニングを行ったところ、ヤナギ科植物であるオノエヤナギ (*Salix sachalinensis*) が最も少ない葉相当量 (新鮮重を基準にして) で抗菌活性を示した。このオノエヤナギの葉に含まれる主たる抗菌活性成分を単離し、解析したところ、この成分はヤナギ科植物に一般的に含まれる salicin 系統の化合物ではなく、

dihydroflavonol の一種である ampelopsin (1) [(2*R*, 3*R*)-(+)-5,7,3',4',5'-pentahydroxydihydroflavonol] であることが明らかとなった。本化合物はすでにオノエヤナギから得られた報告がある^(3,4)。オノエヤナギ以外のヤナギ科植物としては, *Populus balsamifera*⁽⁵⁾, *Salix pet-susu*⁽⁶⁾, イチョウ科 *Ginkgo biloba*⁽⁷⁾, カツラ科 *Cercidiphyllum japonicum*⁽⁸⁾, クロウメモドキ科 *Hovenia dulcis*⁽⁹⁾, ツツジ科 *Rhododendron* spp.⁽¹⁰⁾, ハンニチバナ科 *Cistus incanus*⁽¹¹⁾, ブドウ科 *Ampelopsis meliaeifolia*⁽¹²⁾, フトモモ科 *Eugenia jambolana*⁽¹³⁾, マツ科 *Cedrus deodara*⁽¹⁴⁾, *Pinus contorta*⁽¹⁵⁾, マメ科 *Adenathera pavonina*⁽¹⁶⁾ に散在しているが, 一般にその含量は小さい。

1 は, 分子内にフェノール性水酸基を五つもつポリフェノールでその抗酸化活性に基づく抗変異原剤⁽¹⁷⁾や, 紫外線を吸収する性質による化粧品への応用^(18,19)などが図られている。またアルコール性筋弛緩抑制作用⁽⁹⁾などの生理活性が報告されている。

また, 1 は分子内に水酸基を 6 個含み, マメ科植物に一般的なフラボノイド系ファイトアレキシン類⁽²⁰⁾に比べてかなり極性が大きい。そこで, 分子の極性を低下させることにより, 抗菌活性の増大がみられるかどうかを検討するために, 1 のメチル化およびアセチル化誘導体を調製した。これらの脂溶性を高めた誘導体を用いて, *Cladosporium herbarum* を検定菌とした抗菌活性試験を実施した。

実 験 結 果

1. 植物試験

実験に用いた植物試料 (オノエヤナギ *Salix sachalinensis*, イヌコリヤナギ *Salix integra*, エゾノカワヤナギ *Salix miyabeana*, マルバノバッコヤナギ *Salix hultenii*, キタコブシ *Magnolia praecocissima*, およびシンジュ *Ailanthus altissima*) は北海道大学構内, あるいは札幌市内に自生しているものを用いた。

2. 各植物の抗菌活性試験 (TLC-bioautography)

採集した植物葉部 5 g (新鮮重) を, 5 mL の 60% アセトンに 7 日間浸漬し抽出を行った。その後, 抽出残渣を 5 mL の 60% アセトンで 3 回すすぎ, これらをまとめて濃縮し, 最終的に 60% アセトンで 5 mL に定容した。この粗抽出液を薄層板 (Silica gel 60 F₂₅₄, 厚さ 0.25 mm, Merck 社) にそれぞれ, 植物新鮮重量

2, 4, 8, 16 mg 相当量をチャージし展開した (展開溶媒: 酢酸エチル-メタノール-水=12:3:2)。展開後, Homans-Fuchs の方法⁽²¹⁾に従い, 風乾した薄層板に被験菌 *Cladosporium herbarum* の孢子懸濁液を噴霧し, 加湿した 25℃ の培養器で 2~3 日間培養し胞子を形成させた。結果は薄層板上に形成される増殖阻止領域の有無によって判断した。

3. Ampelopsin (1) の抽出

オノエヤナギ葉部 1.3 kg (新鮮重, 1996 年 9 月 16 日採集) を 13 L の 60% アセトンに 7 日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を 1 L に濃縮すると 1 の粗結晶が 6.4 g 析出した。さらに母液を濃縮することによって計 40.0 g の 1 を得た。

Ampelopsin (1) の物理化学的性質を以下に示す。

Colorless needles, mp 221~225℃ (dec.), $[\alpha]_D^{25} + 22.3^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH) [文献値⁽⁴⁾ + 17.2° (MeOH)], EIMS (m/z , %): 320 (M^+ , 48), 318 (47), 291 (43), 180 (42), 166 (45), 153 (100), 139 (61), 126 (74), ¹H-NMR δ ppm (acetone-*d*₆, 270 MHz): 4.55 (H, d, $J = 11.2$ Hz, H-3), 4.66 (H, br. s, OH-3), 4.94 (H, d, $J = 11.2$ Hz, H-2), 5.94 (H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.98 (H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.62 (2 H, s, H-2' and 6'), 7.98 (br. s, OH-7,3',4' and 5'), 11.71 (H, br. s, OH-5), UV λ_{max} (MeOH); 292 nm ($\log \epsilon$ 4.23)。

4. Ampelopsin (1) の定量

オノエヤナギから得られた 1 は以下の方法によって定量を行った。約 5 g の植物体を 100 mL の 80% メタノールに 10 日間浸漬した。その後溶媒を換えて再び 10 日間浸漬し, これらの抽出物をまとめて濃縮し, 10 mL に定容した。この抽出物の 25 μ L (植物体 12.5 mg 相当) を薄層板 (Silicagel 60F₂₅₄, 厚さ 0.25 mm, Merck 社) にチャージし, 展開溶媒トルエン-酢酸エチル-イソプロパノール-ギ酸=40:30:20:1 で展開した。展開後, 1 のスポットに相当するシリカゲル層をかき取り, 10 mL のメタノールに加えて, 攪拌後冷蔵庫で静置し, その上清を用いて, 1 の最大吸収波長 292 nm で吸光度を測定した。吸光度測定のブランクは溶媒のみチャージした薄層板の 1 に相当する部位を同様にかき取り, メタノールに加えて得た上清を用いた。標品の 1 500 μ g を同時に薄層板にチャージし, 展開後同様に分取し吸光度を測定し, 試料の吸光度と比較することによって試料中の 1 の量を算出

した。測定は薄層板のチャージ段階から、試料では2反復、標品は薄層板ごとに2反復とした。

5. Ampelopsin (1) の誘導体化

Ampelopsin を以下の方法によってメチル化およびアセチル化し、各誘導体を得た。

1) メチル化反応 A: **1** 1.0 g (3.1 μmol) をごく少量のメタノールに完全に溶解した後、常法⁽²²⁾によって調製したジアゾメタンエーテル溶液 60 mL (ca. 45 μmol) を加え、水中で4時間、攪拌しながら反応させた。この反応液をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60 spherical 粒径 100~210 μm) によって分画した。最終精製は分取薄層クロマトグラフィー (Silica gel 60 F₂₅₄, 厚さ 0.25 mm) によって行った。

2) メチル化反応 B: **1** 100 mg (0.31 μmol) をごく少量のメタノールに完全に溶解した後、調製したジアゾメタンエーテル溶液 20 mL (ca. 15 μmol) を加え常温暗所で17時間、攪拌しながら反応させた。反応物は分取薄層クロマトグラフィーによって分取、精製を行った。

3) メチル化反応 C: **1** 100 mg (0.31 μmol) をごく少量のメタノールに完全に溶解した後、調製したジアゾメタンエーテル溶液 20 mL (ca. 15 μmol) を加え常温暗所で17時間、攪拌しながら反応させた。この反応液に対してさらにジアゾメタンエーテル溶液 10 mL (ca. 7.5 μmol) を加え、常温暗所で48時間反応させた。反応物は分取薄層クロマトグラフィーによって分取、精製を行った。

4) アセチル化: 小澤らの報告⁽⁴⁾に従って **1** の完全アセチル化物を調製した。

得られた ampelopsin 誘導体 (2~10) の構造は図に示したとおりである。¹H-NMR データを Table I に示した。

7-OMe 誘導体 (2): A の反応液より 53 mg を得た。Pale yellow powder; mp 209~213°C; UV λ_{max} (MeOH) nm: 207, 290; MS m/z (%): 334 (M^+ , 58), 305 (62), 196 (8), 179 (12), 167 (100), 139 (19)。

4'-OMe 誘導体 (3): A の反応液より 6.8 mg を得た。Pale yellow powder; mp 200~205°C; UV λ_{max} (MeOH) nm: 205, 291; MS m/z (%): 334 (M^+ , 67), 305 (75), 182 (24), 180 (20), 167 (44), 165 (23), 153 (100)。

3'-OMe 誘導体 (4): A の反応液より 9.2 mg を得た。Pale yellow powder; mp 226~229°C; UV λ_{max} (MeOH) nm: 207, 292; MS m/z (%): 334 (M^+ , 68), 305 (63), 182 (41), 180 (30), 167 (12), 165 (15), 153 (100)。

7,4'-OMe 誘導体 (5): A の反応液より 9.8 mg を得た。Colorless powder; mp 188~192°C; UV λ_{max} (MeOH) nm: 205, 290; MS m/z (%): 348 (M^+ , 39), 319 (54), 182 (11), 180 (19), 179 (14), 167 (100), 153 (12)。

7,3'-OMe 誘導体 (6): A の反応液より 3.8 mg を得た。Pale yellow powder; mp 183~188°C; UV λ_{max} (MeOH) nm: 207, 290; MS m/z (%): 348 (M^+ , 39), 319 (59), 182 (20), 180 (34), 179 (13), 167 (100), 149 (16)。

7,3',4'-OMe 誘導体 (7): A の反応液より 6.9 mg, B の反応液より 23.4 mg を得た。Yellow powder; mp 148~153°C (dec.); UV λ_{max} (MeOH) nm: 208, 290; MS m/z (%): 362 (M^+ , 65), 333 (9), 305 (15), 196 (26), 194 (32), 181 (38), 179 (26), 167 (100)。

7,3',4',5'-OMe 誘導体 (8): B の反応液より 11.1 mg を得た。Colorless powder; mp 181~185°C (dec.); UV λ_{max} (MeOH) nm: 210, 291; MS m/z (%): 376 (M^+ , 100), 347 (88), 319 (26), 210 (38), 208 (38), 195 (58), 167 (87)。

5,7,3',4',5'-OMe 誘導体 (9): B の反応液より 1.6 mg, C の反応液より 5.0 mg を得た。Colorless powder; mp 167~175°C (dec.); UV λ_{max} (MeOH) nm: 205, 286; MS m/z (%): 390 (M^+ , 32), 361 (95), 210 (30), 195 (43), 181 (100), 167 (21)。

Hexaacetate (10): Colorless powder; mp 116~120°C; UV λ_{max} (MeOH) nm: 216, 262, 316; MS m/z (%): 572 (M^+ , 0.74), 386 (21), 344 (21), 224 (39), 182 (72), 43 (100)。

得られた ampelopsin 誘導体のうち、4'-位水酸基がメチル化された化合物 **3** (4'-OMe) は、クロウモドキ属 *Rhamnus pallasii* から単離され pallasin⁽²³⁾ として、また 3'-位水酸基がメチル化された化合物 **4** (3'-OMe) は、クロウモドキ属ケンボナシ *Hovenia dulcis* から単離され hovenitin I と命名されている⁽⁹⁾。ケンボナシからは、**1** のみならず、その 3 位エピマー (2R, 3S)-異性体も単離されている。

Table I. ^1H -NMR Data for Ampelopsin (1) and Its Derivatives (2~10)
Coupling constants are shown in parentheses.

		EIMS M^+ (m/z)	UV $\lambda_{\max}$ (nm)	^1H -NMR δ ppm (acetone- d_6 , 270 MHz)											
				H-2	H-3	H-5	H-6	H-7	H-8	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	Other
1	Ampelopsin	320	292	4.94 d (11.2)	4.55 d (11.2)	OH	5.97 d (2.0)	OH	5.94 d (2.0)	6.61 s	OH	OH	OH	6.61 s	3-OH 4.66 br.
2	7-OMe	334	290	4.97 d (11.2)	4.59 d (11.2)	OH	5.99 d (2.3)	OMe	5.95 d (2.3)	6.62 s	OH	OH	OH	6.62 s	
3	4'-OMe	334	291	4.97 d (11.2)	4.55 d (11.2)	OH	5.98 d (2.2)	OH	5.95 d (2.2)	6.64 s	OH	OMe	OH	6.64 s	
4	3'-OMe	334	292	5.00 d (11.7)	4.64 d (11.7)	OH	5.99 d (2.0)	OH	5.95 d (2.0)	6.74 d (1.7)	OMe	OH	OH	6.76 d (1.7)	
5	7,4'-OMe	348	290	5.00 d (11.4)	4.57 dd (3.4, 11.4)	OH	6.07 d (2.3)	OMe	6.05 d (2.3)	6.92 s	OH	OMe	OH	6.92 s	3-OH 4.75 br. d (3.4)
6	7,3'-OMe	348	290	5.04 d (11.4)	4.68 d (11.4)	OH	6.08 d (2.3)	OMe	6.05 d (2.3)	6.75 d (1.8)	OMe	OH	OH	6.77 d (1.8)	
7	7,3',4'-OMe	362	290	5.08 d (11.6)	4.68 d (11.6)	OH	6.09 d (2.2)	OMe	6.06 d (2.2)	6.77 d (1.9)	OMe	OMe	OH	6.79 d (1.9)	3-OH 4.77 br.
8	7,3',4',5'-OMe	376	291	5.13 d (11.6)	4.76 dd (4.3, 11.6)	OH	6.10 d (2.2)	OMe	6.07 d (2.2)	6.94 s	OMe	OMe	OMe	6.94 s	3-OH 4.82 br. d (4.3)
9	5,7,3',4',5'-OMe	390	286	4.99 d (11.6)	4.48 d (2.6, 11.6)	OMe	6.25 d (2.2)	OMe	6.16 d (2.0)	6.92 s	OMe	OMe	OMe	6.92 s	3-OH 4.30 br. d (2.6)
10	3,5,7,3',4',5'-OAc	572	316	5.80 d (12.5)	5.70 d (12.5)	OAc	6.89 d (2.3)	OAc	6.70 d (2.3)	7.45 s	OAc	OAc	OAc	7.45 s	3-OAc 2.00

6. 機器分析

得られた各誘導体は最終精製の後、各種機器分析 ($^1\text{H-NMR}^{(24)}$, $\text{UV}^{(25)}$, $\text{MS}^{(26)}$) によって構造決定を行った。

NMR (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry): JEOL EX-270 (^1H 270 MHz); 測定溶媒 acetone- d_6 ; 内部標準 TMS (tetramethylsilane)

EIMS (Electron impact ionization mass spectrometry): JEOL JMS-AX500 Mass Spectrometer

UV-VIS (Ultra Violet-Visible Absorption Spectrometry): Hitachi U 3210 Spectrophotometer

7. 極性の評価

得られた各化合物の極性の大きさを評価するために、寺田の報告⁽²⁷⁾に従って逆相薄層クロマトグラフィー (RP-18 F₂₅₄, 厚さ 0.25 mm, Merck 社) を行い、その移動度によって各誘導体の極性をおおまかに評価した。

- 1: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{H}$
ampelopsin
- 2: $\text{R}_2=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{H}$
- 3: $\text{R}_4=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{H}$
pallasiin
- 4: $\text{R}_3=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{H}$
hovenitin I
- 5: $\text{R}_2=\text{R}_4=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{R}_5=\text{H}$
- 6: $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{H}$
- 7: $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{R}_5=\text{H}$
- 8: $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{CH}_3$, $\text{R}_1=\text{H}$
- 9: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{R}_4=\text{R}_5=\text{CH}_3$

10: ampelopsin hexaacetate

- 11: $\text{R}=\text{CH}_3$
triandrins
- 12: $\text{R}=\text{H}$
vimalins

- 13: $\text{R}=\text{OH}$
- 14: $\text{R}=\text{H}$

15: salicin

Fig. Structures of Phenolic Compounds Mentioned in the Text.

8. 各誘導体の抗菌活性評価試験

得られた各誘導体の抗菌活性の評価は, Homans-Fuchs の方法⁽²¹⁾ を改変した抗菌試験によって行った⁽²⁸⁾. シリカゲル薄層板 (20×20 cm) に, 一定量の試料を含むアセトン溶液 25 μ L をマイクロシリンジでチャージし, 薄層板上に直径 15 mm の真円を描いた. 試料を濃度別にチャージした薄層板に, 被験菌 *Cladosporium herbarum* の孢子懸濁液を噴霧し, 加湿した 25°C の培養器で培養した. このとき形成する増殖阻止円から, 抗菌活性を 4 段階に分類し評価した. 対照試験として, 代表的な抗菌剤であるシクロヘキシミドのアセトン溶液を各薬量, および溶媒のアセトンのみをチャージしたものを同時に行った. 抗菌試験は 2 反復で実施した.

実験結果

1. 各植物の抗菌活性試験

Cladosporium herbarum を検定菌とした抗菌活性試験 (TLC-bioautography) によって各植物葉の 60% アセトン抽出物の抗菌活性を評価した結果を Table II に示した. 本試験で用いた 6 種の植物のうち, オノエヤナギに強い生育阻止領域が認められた. これは, 本試験で最も投与量の少ない葉の新鮮重量 2 mg 相当の粗抽出物でも生育阻止領域が認められるものであった. キタコブシでは 8 mg 相当で *Cladosporium herbarum* の増殖に対して抑制的効果が認められ, またエゾノカワヤナギでは 16 mg 相当で弱いながら生育阻止領域が観察された. そこで, 植物の葉相当量で最も強い抗菌活性を示したオノエヤナギについて, 抗菌活性本体の追跡を行った.

2. Ampelopsin (1) の同定

オノエヤナギの葉を 60% 含水アセトンで抽出し, 部分濃縮して析出した結晶は TLC 上で抗菌活性物質と同じ挙動を示した. 結晶は質量分析によって m/z 320, 分子式 $C_{15}H_{12}O_8$, 1H -NMR データ (Table I) を文献値^(4, 14) と比較することによって本化合物が ampe-
lopsin (1) と同定された. 以上のことから, オノエヤナギ粗抽出物中の最も主要な抗菌活性物質は高度に酸化されたジヒドロフラボノールの一つである ampe-
lopsin [(2*R*, 3*R*)-(+)-5,7,3',4',5'-pentahydroxydihydroflavonol, 1] であることが明らかとなった.

3. Ampelopsin (1) の定量

札幌市内新川堤防でサンプリングした雌雄各 6 株のオノエヤナギの 1 含量を測定した結果を Table III に示した. 結果より, 株による 1 の含量に大きな違いが認められたが, その違いは雌雄の別とは無関係であると推測された.

次に, オノエヤナギの部位別の 1 の定量結果を Table IV に示した. 結果より, オノエヤナギに含まれる主要な抗菌物質である 1 は, 主として葉部に含まれており, 当年枝の木質部には全く含まれていないことが明らかとなった. また展葉直後の新葉にも成葉とはほぼ同程度の 1 が含まれていることが明らかとなった.

4. Ampelopsin 誘導体 (2~10) の抗菌活性試験

3 種の異なるメチル化反応およびアセチル化反応を行い得られた ampe-
lopsin 誘導体 (2~10) の構造を Fig. に示した.

被験菌 *Cladosporium herbarum* に対する抗菌活性試験の結果を Table V に示した. 1 は 80 μ g の投与量で菌糸生育抑制活性が発現 (抗菌活性が $\pm$) し, 160

Table II. Antifungal Assay of Some Leaf Extracts against *Cladosporium herbarum* (TLC-bioautography)

Plant species	Fungal response to each dose ^a (leaf weight equivalents)				R_f value ^b
	2 mg	4 mg	8 mg	16 mg	
<i>Salix hultenii</i>	—	—	—	—	
<i>Salix sachalinensis</i>	+	+	+	+	0.85
<i>Salix miyabeana</i>	—	—	$\pm$	+	0.62
<i>Salix integra</i>	—	—	—	—	
<i>Magnolia praecocissima</i>	—	—	—	—	
<i>Ailanthus altissima</i>	—	—	$\pm$	$\pm$	0.88

^a +, clear antifungal zone; $\pm$, partial growth suppression; —, inactive.

^b R_f value means the location of antifungal zone.

Table III. Contents of Ampelopsin (1) in Some Strains of *Salix sachalinensis* (Collected on August 7, 1997)

Female contents (mg/g)			Male content (mg/g)		
Strain No.	Per fresh weight	Per dry weight	Strain No.	Per fresh weight	Per dry weight
1	71.2	204.1	7	63.5	182.4
2	20.4	52.8	8	13.4	36.3
3	40.8	115.3	9	56.4	148.7
4	58.3	161.0	10	43.4	110.4
5	33.9	97.7	11	29.4	95.3
6	5.6	15.1	12	45.5	136.1
Average	38.4	107.7	Average	41.9	118.2

Table IV. Contents of Ampelopsin (1) in Some Parts of *Salix sachalinensis* (Strain No. 7 in Table III and Collected on June 4, 1997)

Part of plant	Contents (mg/g)	
	Per fresh weight	Per dry weight
Leaf	54.5	157
Xylem of current shoots	0	0
Bark of current shoots	2.98	nd ^a
Flush	62.9	nd

^a Not determined.

Xylem of current shoots contains triandrin (11) and vimalin (12) as major phenolics (Tahara, unpublished).

μg の投与量でほぼ完全な生育阻止円(++)を形成した。

メチル化誘導体およびアセチル化誘導体において、抗菌活性が 1 よりも上昇したものは 2 (7-OMe), 3 (4'-OMe), 5 (7,4'-OMe), および 7 (7,3',4'-OMe) であり、出発物質 1 の抗菌活性と比較して 2~4 倍の活性上昇がみられた。これら抗菌活性が上昇した誘導体に共通することは 1 の 7-位あるいは 4'-位水酸基がメチル化されていることである。水酸基のほとんどがメチル化された誘導体 9 (5,7,3',4',5'-OMe) あるいはすべての水酸基がアセチル化された誘導体 10 (3,5,3',4',5'-OAc) では 160 μg でもほとんど菌糸生育抑制活性を示さなかった(抗菌活性が-, あるいは±)。

抗菌活性の上昇がみられた誘導体はいずれも 1 より極性が低下していると予想されたので、各誘導体の極性と抗菌活性の対比を行ったところ (Table V),

2 (7-OMe), 3 (4'-OMe), 4 (3'-OMe) のように、逆相 TLC での移動度に大きな違いがない異性体同士であっても、その抗菌活性に大きな違いが認められたことから、分子の立体構造や官能基の位置が抗菌活性に大きな影響を与えているものと思われた。

考 察

札幌周辺に自生する身近な植物を材料として、葉の新鮮重量を基準に粗抽出物の抗菌活性を検討したところ、6 種の植物中でオノエヤナギ葉の抽出物に最も強い抗菌活性が認められた。TLC-bioautography の結果、ampelopsin (1) が主要な抗菌活性本体であることが明らかとなった。1 は代表的な抗菌物質であるシクロヘキシミドとの比較からも、比活性は弱いものと考えられる。しかし、オノエヤナギの葉には 1 が乾燥重量の最大 20% 程度含まれており (Table III), このように大量に蓄積することで抗菌活性を発現しているものと考えられる。1 は他の植物中にもその存在が確認されているが、これほど多量に含まれている例はなく、またそのほとんどが葉に局在していることが明らかとなった (Table IV)。Lee ら⁽²⁹⁾ は、オノエヤナギ茎葉部の 1 含量が乾物当たり 2.5% と報告しているが、Table IV からわかるように、当年枝の木化部には 1 が検出されないで、Lee らの場合も葉の含量ははるかに高かったものと推測される。若い枝の木質部の主たるフェノール成分は 1 ではなく triandrin (11) であり、vimalin (12) も少量検出された (田原, 未発表)。オノエヤナギが 1 をこれほど多量に蓄積する意義については興味もたれるが、今のところ十分な説明はできない。

オノエヤナギには化学成分を異にする少なくとも二

Table V. Antifungal Activities of Ampelopsin (1) and Its Derivatives (2~10) against *Cladosporium herbarum*, and Their R_f Values on Reverse Phase Thin-layer Plates

Compounds	Antifungal activity/Dose (μg /circular zone with 15 mm i.d.) ^a					R_f values ^b Methanol/water=3/2
	160	80	40	20	10	
1 Ampelopsin	++	±	—	—	—	0.71
2 7-OMe	++	+	±	—	—	0.50
3 4'-OMe	++	+	±	—	—	0.63
4 3'-OMe	—	—	—	—	—	0.58
5 7,4'-OMe	++	+	±	—	—	0.35
6 7,3'-OMe	±	±	—	—	—	0.34
7 7,3',4'-OMe	++	++	+	±	—	0.23
5 7,3',4',5'-OMe	—	—	—	—	—	0.14
9 5,7,3',4',5'-OMe	—	—	—	—	—	0.18
10 3,5,7,3',4',5'-OAc	+	—	—	—	—	0.19

^a ++, clear inhibitory zone > 15 mm i.d.; +, clear inhibitory zone < 15 mm i.d.; ±, partial suppression of fungal growth; —, inactive.

^b TLC R_f values on RP-18, 0.25 mm thickness, plates (Merck).

つの化学種 (Chemical races; 1 を主成分とする flavonoid race および化合物 13 や 14 を主成分とする phenylpropanoid race) が存在することが知られている⁽³⁾ が, 札幌周辺では調査した 105 株中 99 株が flavonoid race であった⁽³⁰⁾. 興味深いことに, ヤナギ属植物の代表的な二次代謝産物は salicin (15) あるいはその誘導体であるとされているが⁽²⁾, オノエヤナギには salicin 類はほとんど含まれていない.

また, 1 は植物由来フラボノイド系抗菌物質と比べると分子中の遊離の水酸基が多く, かなり極性が高い⁽²⁰⁾. そこで, 1 を誘導化し極性を小さくすることによって 1 とその誘導体の構造と抗菌活性の相関を調べた. 本試験で調製した 9 種の ampelopsin 誘導体 (2~10) のうち, 最も抗菌活性が上昇したのは 7 (7,3',4'-OMe) であった. また, 得られた各誘導体の逆相薄層クロマトグラフィーでの移動度を分子の極性の尺度とし⁽²⁷⁾, 抗菌活性との相関が見られるかを検討したが, 同程度の移動度を示す異性体同士でも, その抗菌活性には大きな違いがあり (Table V), 各誘導体の極性と抗菌活性について直接的な関係は認めにくかった. 一般に, 分子の極性は膜透過性に関与するものと考えられるが, ampelopsin 誘導体の, 被験菌 *Cladosporium herbarum* に対する抗菌活性においては, 膜透過性だけでなく, 立体構造, あるいは分子の局所的な電氣的性質がより大きく寄与しているものと推測さ

れた.

要 約

札幌周辺に自生する身近な植物を材料に抗菌活性を指標にスクリーニングしたところ, オノエヤナギの葉の抽出物に最も強い抗菌活性が認められた. 活性本体の追跡の結果, 比活性は小さいものの, 極めて大量 (乾燥重量当たり最大 20%) に含まれる抗菌活性本体 ampelopsin [2R, 3R-(+)-5,7,3',4',5'-pentahydroxydihydroflavonol, 1] を得た. オノエヤナギの各部位に含まれる 1 を定量したところ, 主として葉部に局在していることが明らかとなった. さらに, ampelopsin 誘導体 (2~10) を調製し, 抗菌活性の比較を行ったところ 7,3',4'-OMe 体 (7) で 2~4 倍の活性増大が見られたが, 抗菌活性と各誘導体の極性の間には, 明らかな相関は認められなかった.

謝 辞 本研究の一部は, 文部省創成的基礎研究 (09NP1501, 代表 川那部浩哉) の研究費補助金によって実施されましたことを記して, 謝意を表します.

- (1) J. L. Ingham: *Phytopath. Z.*, **78**, 314-335 (1973).
- (2) R. Hegnauer: "Chemotaxonomie der Pflanzen," Vol. III, Birkhäuser Verlag, 1973, pp. 240-258.
- (3) M. Mizuno, M. Kato, M. Iinuma, T. Tanaka, A. Kimura, H. Ohashi, H. Sakai, and T. Kajita: *Bot. Mag. (Tokyo)*, **102**, 403-411 (1989).

- (4) 小澤修二, 李 学州, 笹谷宣志, 千葉 茂: 日本木材学会北海道支部講演集, **22**, 49-54 (1990).
- (5) I. A. Pearl and S. F. Darling: *Phytochemistry*, **8**, 2393-2396 (1969).
- (6) S. Ohara and H. Hujimori: *Mokuzai Gakkaishi*, **42**, 618-623 (1996).
- (7) H. A. Stafford, K. S. Kreitlow, and H. H. Lester: *Plant Physiol.*, **82**, 1132-1138 (1986).
- (8) M. Hasegawa: *Misc. Reps. Res. Inst. Natl. Resour.* (Tokyo), **17-18**, 57-60 (1950).
- (9) 吉川雅之, 村上敏之, 植田知彦, 吉積智司, 二宮清文, 村上啓寿, 松田久司, 齊藤雅之, 藤井 互, 田中隆治, 山原条二: 薬誌, **117**, 108-118 (1997).
- (10) J. B. Harborne and C. H. Williams: *Phytochemistry*, **10**, 2727-2744 (1971).
- (11) F. Petereit, H. Kolodziej, and A. Nahrstedt: *Phytochemistry*, **30**, 981-985 (1991).
- (12) M. Kotake and T. Kubota: *Liebigs Ann. Chem.*, **544**, 253-271 (1940).
- (13) S. Subramanian and A. G. R. Nair: *Curr. Sci.*, **41**, 703-704 (1971).
- (14) P. K. Agrawal, S. K. Agarwal, and R. P. Rastogi: *Phytochemistry*, **19**, 893-896 (1980).
- (15) H. L. Hargett: *J. Org. Chem.*, **21**, 534-537 (1956).
- (16) A. Gennaro, L. Merline, and G. Nasini: *Phytochemistry*, **11**, 1515 (1972).
- (17) 小島 肇, 三輪信夫, 平尾雅郎, 小西宏明: 公開特許, 昭 89-175932.
- (18) 小山和夫, 平尾雅郎, 堅田友則, 丹羽 章, 小西宏明: 公開特許, 昭 88-208506.
- (19) 平尾雅郎, 堅田友則, 前田圭子, 大島 学, 小西宏明: 公開特許, 昭 88-316711.
- (20) J. L. Ingham: Phytoalexins from the Leguminosae. In "Phytoalexins," ed. by J. A. Bailey and J. W. Mansfield, Blackie, Glasgow, 1982, pp. 21-80.
- (21) A. L. Homans and A. Fuchs: *J. Chromatogr.*, **51**, 327-329 (1970).
- (22) 東京大学農芸化学教室: "改訂新版 実験農芸化学" 下巻, 朝倉書店, 1960, pp. 582-610.
- (23) A. Sakushima, M. Coskun, S. Hisada, and S. Nishibe: *Phytochemistry*, **22**, 1677-1678 (1983).
- (24) K. R. Markham and T. J. Mabry: Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy. In "The Flavonoids," ed. by J. B. Harborne, T. J. Mabry, and H. Mabry, Chapman & Hall, London, 1975, pp. 45-77.
- (25) T. J. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Thomas: "Systematic Identification of Flavonoids," Springer-Verlag, Berlin, 1970, pp. 35-40 and 165-174.
- (26) T. J. Mabry and K. R. Markham: Mass spectrometry of flavonoids. In "The Flavonoids," ed. by J. B. Harborne, T. J. Mabry, and H. Mabry, Chapman & Hall, London, 1975, pp. 78-126.
- (27) 寺田 弘: 化学増刊, **107**, 65-78 (1986).
- (28) S. Tahara, S. Nakahara, J. Mizutani, and J. L. Ingham: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1471-1477 (1984).
- (29) H. Lee, N. Watanabe, T. Sasaya, and S. Ozawa: *Mokuzai Gakkaishi*, **39**, 1409-1414 (1993).
- (30) 松本剛史: 修士論文, 北海道大学大学院農学研究科, 平成 12 年 3 月, pp. 59-60.