

バラ科シモツケ属植物の他感物質に関する研究

森田沙綾香*

キーワード：ユキヤナギ、シジミバナ、シス-ケイ皮酸、シス-ケイ皮酸グルコシド、植物生育阻害活性

Keywords: *Spiraea thunbergii* Sieb, *Spiraea prunifolia* Sieb. *cis*-Cinnamic acid, *cis*-Cinnamoyl glucosides, Plant growth inhibitors

緒 言

近年、食の安全や環境保全への関心が高まる中、我が国は食料供給の安定を確保しながら自然循環機能を生かした安全で持続的な農業生産体系を目指しており、雑草管理をするにおいても環境に負荷を与えない除草剤等が求められている。植物には、自身が生きぬく為に他の植物や微生物に対して何らかの生理活性をもった化学物質を放出する現象、他感作用という現象がある。その植物が放出する生理活性物質・他感物質は、環境に放出されたとしてもその代謝系は普遍的に存在するため比較的安全性が高いと考えられ、現在植物自身も他感作用を利用した雑草管理が試みられている¹⁾。そこで本研究も他感物質あるいは他感作用を示す植物を利用した雑草管理法の開発を目指し研究を開始した。本報では、生理活性を示す植物の提案およびそこに含まれる植物生育阻害物質の分離・精製を行い、その化学構造、植物生育阻害活性、およびその活性本体を明らかにする。

1. 生理活性の高い植物の検索

本研究では92種の木本植物を対象植物に検索を行った。生葉は2002および2003年の4-8月に福井県立大学および福井県総合グリーンセンターにて採取し、採取した生葉はその日のうちに実験に供した。葉から放出される溶脱物質を簡便に検索するためのバイオア

ッセイ法(サンドイッチ法)が開発されている²⁾。本研究では、これに若干の変更を加えた手法を用いて生理活性を検索した¹⁴⁾。結果、レタス幼苗の生育を抑制する植物、あるいは促進する植物を確認した。その中で最も高活性を示した植物は、バラ科シモツケ属のユキヤナギ(*Spiraea thunbergii* Sieb.)およびシジミバナ(*S. prunifolia* Sieb)で、両者ともにレタス種子の発芽を完全に阻害した。

2. ユキヤナギに含まれる植物生育阻害物質の単離・同定

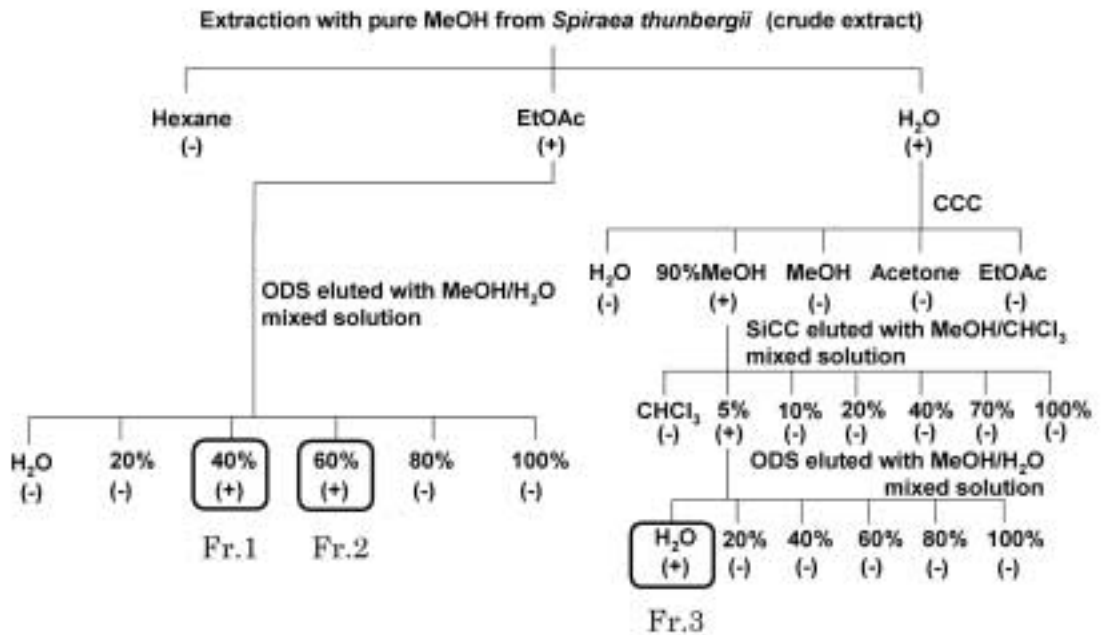
生理活性物質を除草剤として利用する場合、比活性(化合物の重量あたりの生理活性)の高い化合物が要求される。比活性とはEC₅₀値(化合物が示す生理作用の50%を示す濃度)で表され、その値は小さいほど高活性であることを示す。リビングマルチなど植物体そのものを雑草防除に利用する場合は、全活性の高い植物が要求される。全活性とは化合物の体内濃度がEC₅₀値の何倍にあたるかで表され、この数値は高いほど高活性を示す³⁾。従って、全活性はその化合物の強さと植物に含まれる物質の量の両方の要因を含んでいるため、比活性として価値が高い化合物でもその物質の体内含有量が少なければ全活性は低くなる。植物そのものを利用する雑草防除では、全活性の高い化合物が要求される。本研究では、全活性を指標としてユキヤナギの生葉110gから植物生育阻害物質を第1図に従って精製した。得られた活性画分Fr.1, 2および3に含まれる活性物質は、分取HPLCを用いて単離した。単離した活性物質の構造を決定するために、NMR (¹H : 600MHz, ¹³C : 150.80MHz) および二重収束型質量分析計(FAB-MS;SX102A, 日本電子)によりスペクトルを測定した。

その結果、Fr.1および2からは6-*O*-(4'-hydroxy-2'-methylene-butyryl)-1-*O*-*cis*-cinnamoyl-β-D-glucopyranose (*cis*-BCG), Fr.3からは1-*O*-*cis*-cinnamoyl-β-D-glucopyranose (*cis*-CG)であることが明らかとなった(第2図)。*cis*-BCGおよび*cis*-CGは

* (独)農業環境技術研究所生物多様性研究領域 〒305-8604 茨城県つくば市観音台3-1-3

howan@affrc.go.jp

Sayaka Morita: Allelopathic potential of *Spiraea* species. National Institute for Agro-Environmental Sciences, Biodiversity division, 3-1-3 Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan (2006年5月29日受理)



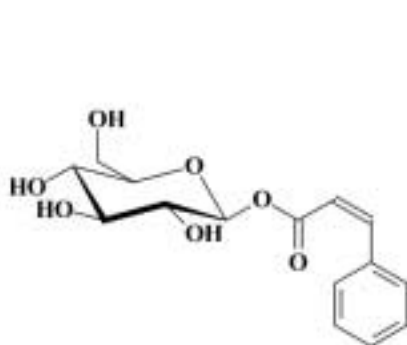
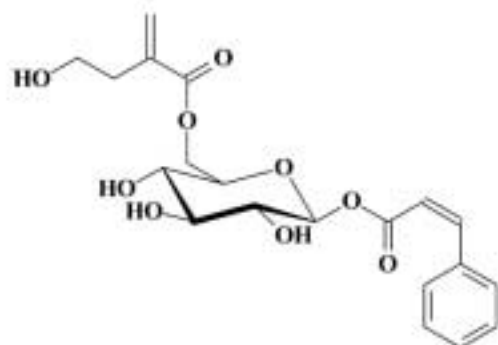
第1図 ユキヤナギ粗抽出液の精製

CCC:活性炭カラムクロマトグラフィー SiCC:シリカゲルカラムクロマトグラフィー ODS: ODS固相抽出

いずれも新規の生理活性物質であり、ユキヤナギ生葉中の*cis*-BCGと*cis*-CGの含有量はHPLC分析から、それぞれ2.95, 0.64 $\mu\text{mol/g}$ F.W.であった。また、両化合物がユキヤナギが示す植物生育阻害活性の要因であることも明らかとなった。

3. シジミバナに含まれる植物生育阻害物質の単離・同定

シジミバナはマラリアの治療のための伝統的な医薬として中国で使用され、現在は抗炎症剤としての研

1-*O*-*cis*-cinnamoyl- β -D-glucopyranose*cis*-CG6-*O*-(4'-hydroxy-2-methylene-butyroyl)-1-*O*-*cis*-cinnamoyl- β -D-glucopyranose*cis*-BCG

第2図 ユキヤナギの植物生育阻害活性物質

究が行われている^{15, 16)}。しかしながら、植物生育阻害物質を研究した例はない。本研究では、レタス種子に対して強い生育阻害活性を示したシジミバナの活性物質を、ユキヤナギの場合同様、全活性を指標とした精製により単離し、その構造を明らかにした。

シジミバナの生葉55gから得た抽出液を溶媒抽出、活性炭カラムクロマトグラフィー、ODS固相抽出で順次精製し、活性画分はさらにHPLCを用いて精製した。

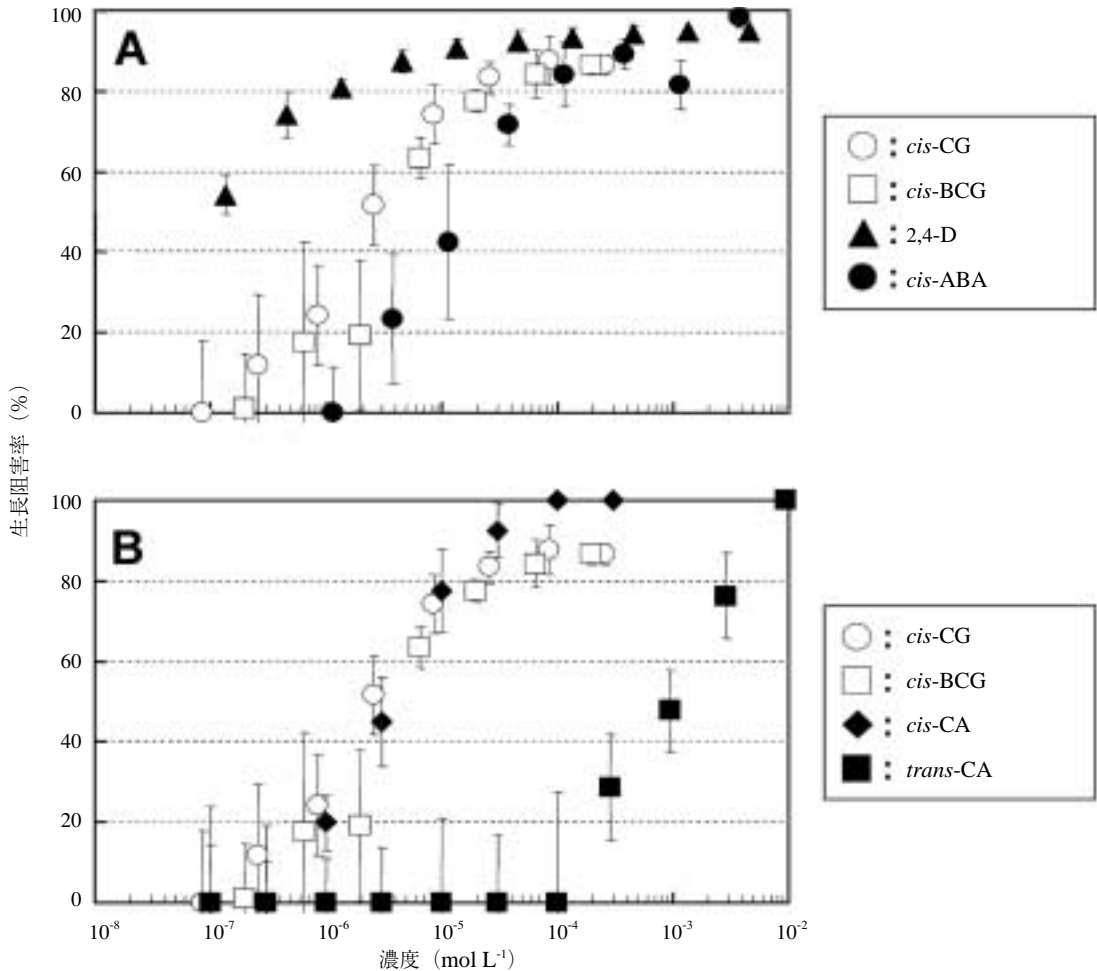
シジミバナはユキヤナギと同科同属であることから、シジミバナの活性物質はユキヤナギの活性物質である *cis*-CG、*cis*-BCGあるいは、その類縁化合物である可能性が考えられた。HPLC分析により得られた活性画分は、保持時間および紫外線吸収波長が*cis*-CGと完全に一致した。また、このHPLCにより分離さ

れた活性画分は、*cis*-CGと同一の¹H-NMRスペクトルを示したことから、シジミバナ粗抽出液中に*cis*-CGの存在が明らかとなった。

シジミバナ粗抽出液が示した植物生育阻害活性が、*cis*-CGにより全てが説明可能であるか否か調べるため、粗抽出液の活性をその粗抽出液に含まれる*cis*-CGの濃度で表示した。その結果、シジミバナ粗抽出液の示す植物生育阻害活性は*cis*-CGの活性でほぼ全て説明可能であった。このことからシジミバナの植物生育阻害物質は*cis*-CGと同定した。

4. *cis*-CGおよび*cis*-BCGの生理活性の特性

cis-CGと*cis*-BCGの比活性を明らかにするために、単離した*cis*-CG、*cis*-BCGの活性を*cis*-ABAと2,4-PAと比較した(第3-A図)。*cis*-CGと*cis*-BCG

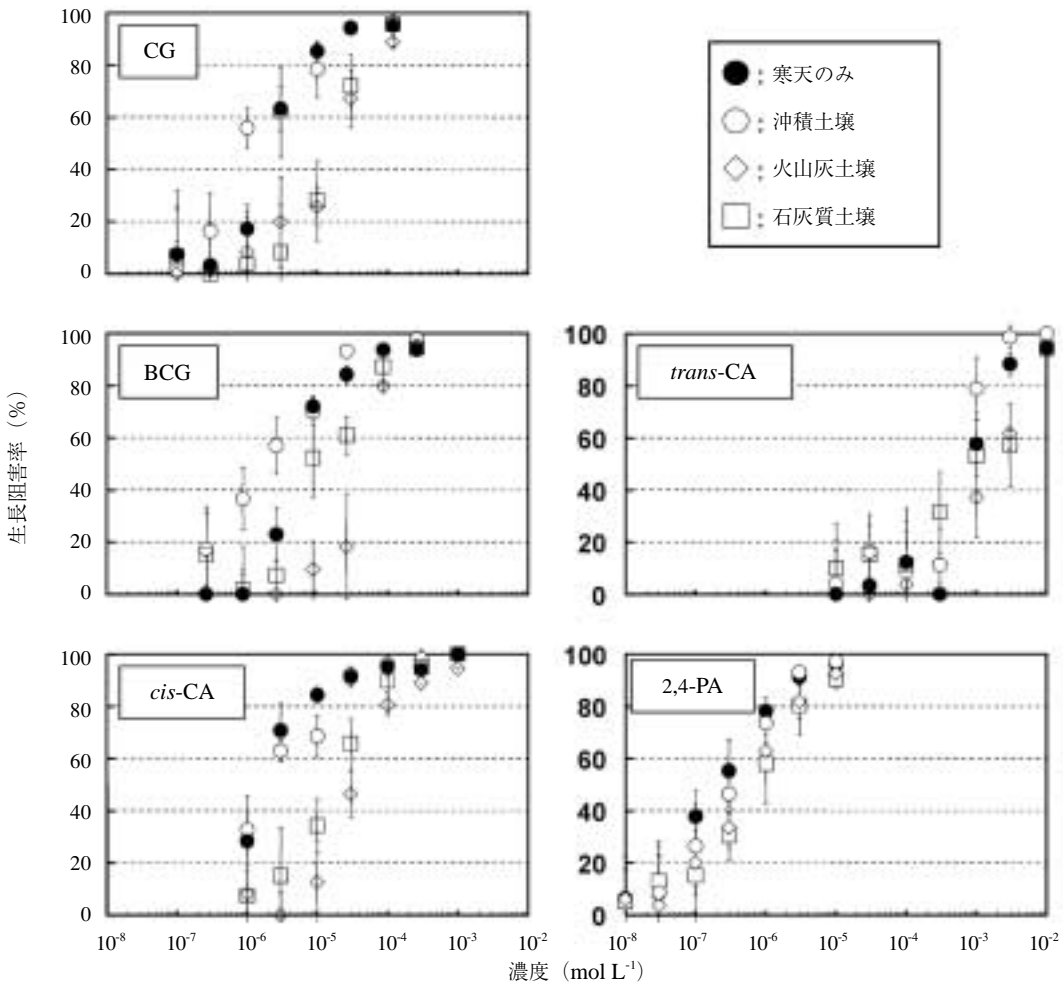


第3図 *cis*-CG、*cis*-BCG及び対照化合物の幼根伸長阻害活性

の活性は同程度で、いずれもEC50値は $10^{-6} \sim 10^{-5}$ mol L⁻¹であった。また、これらの化合物の活性は、合成除草剤である2,4-PAより弱いものの、天然物で最も高活性なグループとして知られる*cis*-ABAよりも強いことから、*cis*-CGと*cis*-BCGは極めて強い植物生育阻害活性を持っていることが明らかとなった⁶⁾。その強い阻害活性が*cis*-CGと*cis*-BCGの化学構造の中でどの部分構造に起因しているのか明らかにするために、それら化合物のアグリコンである*cis*-ケイ皮酸とその立体異性体である*trans*-ケイ皮酸の活性をこれら化合物の活性と比較した(第3-B図)。その結果、*cis*-CGと*cis*-BCGの活性本体は*cis*-ケイ皮酸である

ことが明らかとなった。それと同時に、*trans*-ケイ皮酸は*cis*-ケイ皮酸、*cis*-CGおよび*cis*-BCGよりも1000倍程度活性が弱いことから、高活性を示すには*cis*が必須の立体構造であることも明らかとなった⁹⁾。

実際に*cis*-CGおよび*cis*-BCGを土壤へ添加した場合における、阻害活性の変化を調べるために、これらの化合物それぞれに土壤(沖積土壤、火山灰土壤、石灰質土壤)および寒天を混合した培地を作成し、レタスによるバイオアッセイを行った。土壤が存在しない寒天のみの系では、それぞれの化合物の活性はろ紙を用いたバイオアッセイの結果と同一であり、寒天に対する吸着は無視できるものと考えられた。ど



第4図 *cis*-CG、*cis*-BCG及び対照化合物の土壤中におけるレタスの幼根伸長阻害活性
供試土壤：石灰質土壤 (Hapludalf, Soil Surver Stuff, 1999；Chromic Luvisol, FAO, 1998),
沖積土壤 (Aquept, Soil Surver Stuff, 1999；Anthrosol, FAO, 1998), 火山灰土壤 (Melanudand,
Soil Surver Stuff, 1999；Silandic Andosol, FAO, 1998)。

の化合物についても寒天のみの区が最もレタスの幼根長を阻害した(第4図)。cis-CG, cis-BCG, cis-ケイ皮酸の阻害活性は、火山灰土壌、石灰質土壌中では寒天区より10倍程度弱まった。しかしながら、沖積土壌ではほぼ寒天区と同様の阻害活性を示した。土壌中のFe, Al等金属原子上にある活性化表面水酸基は、有機酸のカルボキシル基などと配位子交換反応を起こし有機酸を土壌に結合することが知られている。その活性化表面水酸基は、火山灰土壌と石灰質土壌のほうが沖積土壌より多いことが明らかにされている⁸⁾。従って、沖積土壌よりも活性化表面水酸基が多い火山灰土壌と石灰質土壌中ではcis-CG, cis-BCG, cis-ケイ皮酸が配位子交換反応によって土壌に多く吸着され阻害活性が弱まったものと考えられた。この結果から、これら化合物は火山灰土壌、石灰質土壌よりも沖積土壌でその活性が発揮されやすいことが明らかとなった。また、ユキヤナギやシジミバナからこれら化合物が放出された場合、土壌環境中での他感物質として機能する可能性が示唆された⁹⁾。

総合考察

植物が示す他感作用を農業へ利用しようとする場合、次の2つの利用法が考えられる。1つ目は植物体そのものを利用する方法、2つ目は植物に含まれる生理活性物質を単離同定してそれを直接またはリード化合物として天然物を起源とする除草剤を開発し利用する方法である。植物体を利用する場合は鋤き込みやマルチ等の材料として利用するもので、用いる対象植物は鋤き込み易く、年間を通して大量に入手可能なものが望ましく、また外来植物の侵入による種の攪乱等を考慮すると、在来種ならびに利用地域の植

生が望ましいと考えられる。その両視点からユキヤナギとシジミバナを利用した雑草管理の可能性について考察する。

植物体そのものを利用する場合、全活性の高いものが望まれる。ユキヤナギおよびシジミバナに含まれるcis-CG, cis-BCGは、比活性も高いことに加え含有量も多いことから、植物体を雑草防除に利用できる可能性は高いと考えられた。このことを明確にするために、これまで他感作用候補物質として報告されているいくつかを第1表に示した。第1表の中ではユキヤナギおよびシジミバナの全活性の評価は最も高かった。また、ユキヤナギは花壇や生垣として利用されるほどわが国において普通に生育するため、容易に葉を入手することが可能で、葉の鋤き込みも容易である。このことから、植物体そのものを使った雑草管理を行う場合、第1表の中では在来種であるユキヤナギが最も可能性が高いと考えられた。

植物由来成分としてユキヤナギ、シジミバナに含まれるcis-CG, cis-BCGを利用する場合、cis-CG, cis-BCGの活性本体であるcis-ケイ皮酸は、その立体異性体であるtrans-ケイ皮酸に紫外線を照射することによって容易に調製できること、またtrans-ケイ皮酸はL-フェニルアラニンからPAL酵素により一段で生合成される2次代謝物質であり、その代謝系は自然界に普遍的に存在することから、環境中への残留による影響は小さいものと考えられること、さらに高活性であることから、cis-CG, cis-BCGそのもの、あるいはその誘導体は天然物起源除草剤として利用価値が非常に高いものと期待される。このように、ユキヤナギ、シジミバナはこれら2つの面で雑草防除への利用に繋がる可能性があり、アレロパシーポテンシ

第1表 他感物質が報告されている植物とこれらに含まれている活性物質のレタス生育阻害物質の比活性と全活性の評価

植物種	化合物名	比活性*	全活性**
エンバク ¹²⁾	L-Tryptophan	2×10^{-4}	0.7
エンドウ ¹¹⁾	Pisatin	3×10^{-5}	1
ヘアリーベッチ ¹⁰⁾	Cyanamide	3×10^{-4}	4~35
ムクナ ²⁾	L-DOPA	2×10^{-4}	200
タイワンレンギョウ ⁷⁾	Durantonins I, II, III	5×10^{-5}	200
ヒガンバナ ³⁾	Lycorine	7×10^{-6}	144~244
ユキヤナギ ⁶⁾	cis-CG, cis-BCG	3×10^{-6}	1000
シジミバナ ¹²⁾	cis-CG	3×10^{-6}	1000

* : mol/l

** : 1/EC₅₀ (mol/l) × 濃度 (mol/l)

ヤルの高い植物であると結論した。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、福井県立大学大学院生物資源学研究所原田二郎教授、同北川靖夫教授には終始熱心に御指導・御教示を受け賜りました。また、(独)農業環境技術研究所藤井義晴研究リーダー、同杉江元研究リーダー、同平館俊太郎主任研究官には常に有益な御助言・御指導を受け賜りました。さらにここに記すことが出来ないほど多くの方から御助言・御協力を受け賜りました。この場をお借りしまして深く御礼を申し上げます。

発表論文および引用文献

- 1) Fujii, Y., Parvez, S.S., Parvez, M.M., Ohmae, Y., and Iida, O. 2003. Screening 239 medicinal plant species for allelopathic activity using the sandwich method. *Weed Biol. Manag.* **3**,233-241.
- 2) Fujii, Y., T.Shibuya and T.Yasuda 1991. L-3, 4-Dihydroxyphenylalanine as an allelochemical candidate from *Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. *Utilis*. *Agric. Biol. Chem.* **55**(2),617-618.
- 3) 藤井義晴・Zahida Iqbal・平館俊太郎・中嶋直子・中谷敬子・高橋道彦 1999. ヒガンバナの他感作用とその作用物質リコリンおよびクリニンの同定. *農業環境研究成果情報* **15**, 31-32.
- 4) Hiradate, S. 2006. Isolation strategies for finding bioactive compounds. In *Natural Products for Pest Management*, A. M. Rimando and S. O. Duke, ACS Symposium Series **927**, 113-126.
- 5) Hiradate, S., S.Morita, A.Furubayashi, Y.Fujii and J.Harada 2005. Plant growth inhibition by *cis*-cinnamoyl glucosides and *cis*-cinnamic acid. *J. Chem. Ecol.* **3**,603-613.
- 6) Hiradate, S., S.Morita H.Sugie Y.Fujii and J.Harada 2004. Phytotoxic *cis*-cinnamoyl glucosides from *Spiraea thunbergii*. *Phytochemistry* **65**,731-739.
- 7) Hiradate, S. and N.Nakajima 1999. Daurantanins I, II and III, as new plant growth inhibitors. In *Proceedings of the International Workshop on Bioactive Chemical in communication*. National Institute of Agro-Environmental Sciences, 124-133.
- 8) Hiradate, S. and N.Uchida 2004. Effects of soil organic matter on pH-dependent phosphate sorption by soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* **50**(5),665-675.
- 9) 堀元栄枝・荒木肇・伊藤一幸・藤井義晴 2002. ヘアリーベッチ (*Vicia villosa* Roth) を利用した水田における雑草抑制と水稲収量への影響. *雑草研究* **47**(3),168-174.
- 10) Kamo, T., S.Hiradate and Y.Fujii 2003. First Isolation of Natural Cyanamide as a Possible Allelochemical From Hairy Vetch *Vicia villosa*. *J. Chem. Ecol.* **29**(2),275-283.
- 11) Kato-Noguchi, H. 2003. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*. *Phytochemistry* **62**,1141-1144.
- 12) Kato-Noguchi, H., J.Mizutani and K.Hasegawa 1994. Allelopathy of oats. II. Allelochemical effects of L-tryptophan and its concentration in oats root exudates. *J.Chem.Ecol.* **20**(2),315-319.
- 13) Morita, S., S.Hiradate Y.Fujii and J.Harada *cis*-Cinnamoyl glucoside as a major plant growth inhibitor contained in *Spiraea prunifolia*. *Plant Growth Regulation* **46**,125-131.
- 14) Morita, S., M.Ito and J.Harada 2005. Screening of an allelopathic potential in arbor species. *Weed Biology & Management* **5**,19-23.
- 15) So, H.S., R.Park, H.M.Oh, K.Y.Chai, J.H.Lee and H.T.Chung 1999. Enhancement of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*'s root in RAW 264.7 cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**,343-355.
- 16) So, H.S., R.Park, H.M.Oh, H.O.Pae, J.H.Lee, K.Y.Chai, S.Y.Chung and H.T.Chung 1999. The methanol extract of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* root inhibits the generation of nitric oxide and superoxide in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **68**,209-217.