



Title	Cryptosporipsis abietinaの産生する生理活性物質について
Author(s)	前川, 道栄; MAEKAWA, Michihide; 菅谷, 藍子 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 32, 29-33
Issue Date	2001-03-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13450
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p29-33.pdf



Cryptosporipsis abietina の産生する生理活性物質について

前川 道栄・菅谷 藍子¹⁾・佐藤 博二^{1,2)}

(日本たばこ株式会社植物開発センター)

(¹⁾北海道大学大学院農学研究科北方資源生態学講座)

(²⁾北海道大学農学部附属農場植物資源科学部門)

(2001 年 1 月 15 日受理)

結 言

Cryptosporipsis abietina は小林らによりヒノキ漏脂病の病原菌として報告されたが¹⁾、その後の周藤らの研究により²⁻⁵⁾、病原菌本体は *Cistella japonica* であり、随伴菌となった菌種である。我々は、ヒノキ漏脂病における大量の樹脂の流出症状に着目し、その病斑形成を病原菌の生産する物質の関与と推定し、病原菌の産生する生理活性物質を「ウカセ」と略称する簡単な生理活性テストを指標に検索を行っている⁶⁾。*Cr. abietina* の産生する生理活性物質としては新規な 21-Nor- $\Delta^{17(21)}$ 不飽和ステロール Abscisterol 類を報告した^{6,7)}。

今回、*Cr. abietina* の培養期間を比較的短期間に設定 (Abscisterol 類生産時の半分以下) すると Abscisterol 類は生成せず、活性物質をして 2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyde **1** と 2,4,5-trihydroxy-6-methylbenzaldehyde **2** の、2 種の benzaldehyde 誘導体を精製単離し、その化学構造を決定した。特に化合物 **2** は文献未記載の新規化合物であった。

実験および結果

1. 培養と分画

Cr. abietina K 91-6 株は 0.2% 寒天を含む 3% グルコース・バレイショ煎汁培地を 500 ml の三角フラスコ (116 本) に 200 ml ずつ分注し、滅菌後、菌を接種、22°C 暗所で 12 日間静地培養を行った。

培養終了後、菌体部を集め、アセトンに浸漬した、アセトン抽出液を濃縮後、アセトン抽出部は

酢酸エチル抽出を行って、酢酸エチル抽出物 (2.05 g) を得た。活性物質のクロマトグラフィーは、ヒノキ鱗片葉を用いた「ウカセ」、さし枝テスト、*Cladsporium harbarum* TLC bioautography の活性テストを並行して行った。

酢酸エチル抽出物 (2.05 g) をシリカゲル (wakoigel C-200, 150 g, カラム 3.6×30 cm) のカラムで、クロロホルム-メタノールの溶媒系でクロロホルム中のメタノール濃度を段階的に上げてクロマトグラフィーを行い、CAM-1~CAM-6 の 6 つのフラクションに分画した (Fig. 1)。CAM-3 (50.8 mg) 画分をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー (kieselgel 60, 6.3 g, カラム 0.9×20 cm) で溶媒系 n-ヘキサン-酢酸エチルに供し、化合物 **1** を 10.8 mg 単離した。CAM-4 (38.8 mg) 画分を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (LH-20, 20 g, カラム 2.6×30 cm) で溶媒系クロロホルム-メタノール 1:1 (v/v) に供し、化合物 **2** を 12.2 mg 単離した。

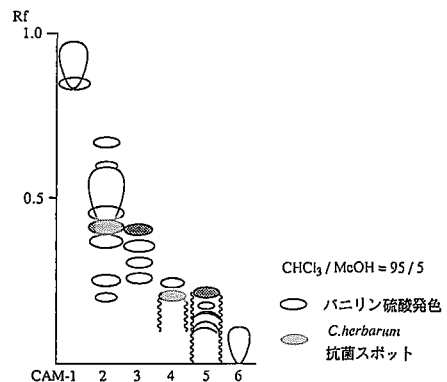


Fig. 1 TLC bioautography of CAM-1~CAM-6

2. 化合物1の化学構造

化合物1は無色パウダー状として単離した。EI-HR-MSより分子式は $C_8H_8O_3$ と決定した。IR-スペクトルから 3100 cm^{-1} に水酸基、 1630 cm^{-1} にカルボニル由来の吸収がそれぞれ見られた。 ^{13}C -NMRスペクトルでは、オレフィン領域に6本のシグナルがあり、ベンゼン環の存在が推定される、 $\delta 194\text{ ppm}$ にカルボニル炭素のシグナルが認められた。 ^1H -NMRスペクトラム (Fig. 2) で $\delta 10.10\text{ ppm}$ にアルデヒドのプロトンが、また $\delta 12.49\text{ ppm}$ と $\delta 9.79\text{ ppm}$ の2つのシグナルは重水置換により消失することから水酸基のシグナルで、特に $\delta 12.49\text{ ppm}$ の水酸基はアルデヒド基と水素結合して低磁場シフトしたと考えられた。 $\delta 2.54\text{ ppm}$ (3 H) にベンゼン環に置換したメチル基のプロトンが、又、 $\delta 6.30\text{ ppm}$ と $\delta 6.17\text{ ppm}$ の各1個分のプロトンが互いに $J=2.3\text{ Hz}$ でメタカップリングを行っているベンゼン環上の2個のプロトンが認められた。NOE差スペクトルの測定の結果、アルデヒドプロトンとメチルプロトンとの間、メチルプロトンと $\delta 6.30\text{ ppm}$ のベンゼン

環プロトンとの間にNOEが観測されたことから、化合物1の構造を、2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehydeと決定した。化合物1は*Aspergillus reglosus*から分離報告がある既知物質である^{8,9)}。

3. 化合物2の化学構造

化合物2は黄色パウダーとして単離した。EI-HR-MSより分子式 $C_8H_8O_4$ はと決定した。化合物2は分子式で1より酸素分子が1個分多いだけで、IR、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMRスペクトルに多くの類似性が見られ、基本的に同一骨格の誘導体と推定した。 ^1H -NMR (Fig. 3) では、化合物1と比較して、ベンゼン環のプロトンが1個しかないこと以外はほぼ同様のシグナルパターンを示したことから化合物2は1にさらに水酸基が1つ置換した5置換ベンゼンと推定した。アルデヒドプロトンとメチルプロトンとの間にNOEが認められ、メチルプロトンとベンゼン環上のプロトンとの間にNOEが観察されなかったことから、化合物2の構造は化合物1の5位にOH基が置換した構造が推定される。ベンゼン環上の残り1個の

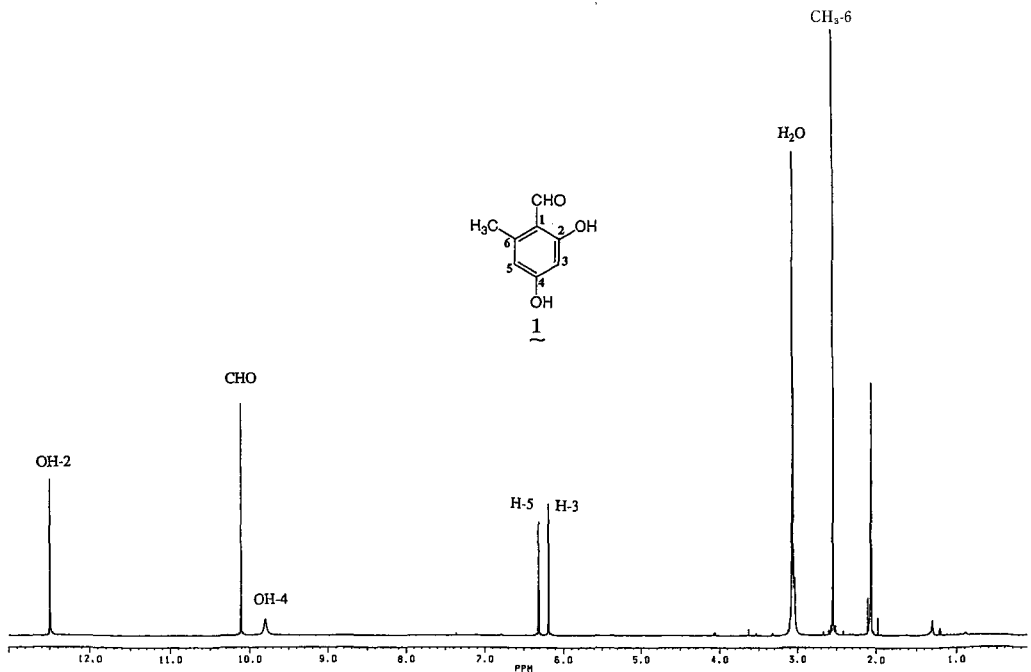


Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of compound 1 (500MHz, CDCl_3)

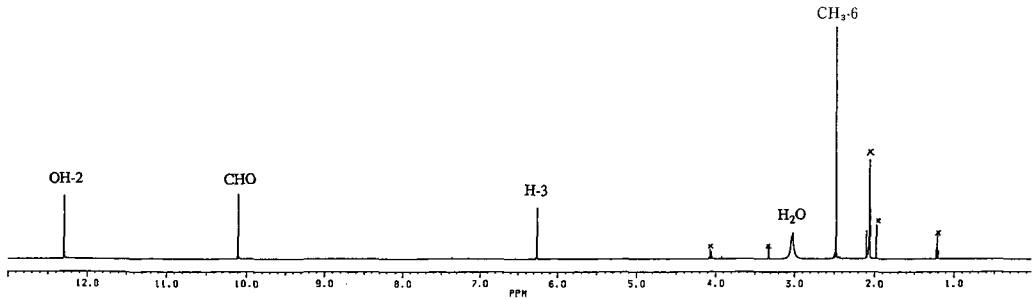
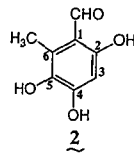


Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 2 (500MHz, CDCl_3)

水酸基の置換位置を特定するために化合物 2 と 2 をジアゾメタン中で部分メチル化した化合物 3 について HMBC を測定し、クロスピークの検出を行い、すべての炭素を帰属して、水酸基がベンゼン環上の 4 位に置換していることを特定した。化合物 2 の構造を 2,4,5-trihydroxy-6-methylbenzaldehyde と決定した。この化合物 2 は文献未記載の新規化合物であった。

4. 化合物 1, 2 の生理活性

ヒノキ枝葉部を 5 cm 程度に切断した先端部を各濃度に調整したサンプル溶液に漬け、3 日間、25°C、明所でインキュベートした結果を Table 1

Table 1 各化合物のヒノキに対する生理活性試験

	化合物 1	化合物 2
500 ppm	+++*)	+++***)
250 ppm	+++**)	++
100 ppm	+++	++
50 ppm	++	+
10 ppm	+	+
control (脱塩水)	-	-

*)：下から 3~4 つの鱗片葉褐変，落下

**)：下から 1~2 つの鱗片葉褐変，落下

***)：下から 1~2 つの鱗片葉褐変，落下

+++：基内部褐変

++：基内部 50% 以上褐変

＋：基内部褐変

に示した。

ヒノキ鱗片葉を用いた「ウカセ」テストでは共に 200 ppm で鱗片葉の脱離活性を示した。*Cladosporium harbarm* を用いた TLC bioautography では共に抗菌性を示した。いずれの生理活性テストにおいても化合物 1 は 2 より高い活性を示した。

化合物 1, 2 のヒノキにおける樹脂細胞誘導性については検討中である。

要 約

Cryptosporipsis abietina の生産した生理活性を持つ benzaldehyde 誘導体の構造を 2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyde 1 と 2,4,5-trihydroxy-6-methylbenzaldehyde 2 と決定した。2 は生理活性を持つ新規化合物であった。これらの構造は、スペクトル分析によって決定した。

謝 辞

Cryptosporipsis abietina の菌株を恵与いただいた森林総合研究所金子繁博士，楠木学博士に，またヒノキ漏脂病について御教示いただいた林木育種センター関西支場片寄操博士，鳥根県林業技術センター周藤靖雄博士に感謝します。

引用文献

1. 小林享夫, 林 弘子, 窪野高德, 田端雅進, 伊藤進一郎: ヒノキ漏脂病に関する病原学的ならびに病理学的研究 I. 病原菌の検索・分類と病原性. 森林総研研報 **357**: 51-93. (1990)
2. Yasuo SUTO, A new species of *Cistella* (Discomycetes) inhabiting bark of *Chamaecyparis obtusa* and *Cryptomeria japonica*, and its cultural characters. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **33**, 433-442 (1992)
3. Yasuo Suto, Traumatic Resin-Canal Formation, Caused by Inoculation with *Cistella japonica* in Secondary Phloem of *Chamaecyparis obtusa*. *J. For. Res.* **3**, 99-102 (1998)
4. Yasuo Suto and Daisuke Ougi, Symptom Development of the Resinous Stem Canker caused by Inoculation with *Cistella japonica* onto *Chamaecyparis obtusa*. *J. For. Res.* **4**, 177-182 (1999)
5. Yasuo Suto, Etiology of Resinous Stem Canker of *Chamaecyparis obtusa*: *Cistella japonica* as the Causal Agent. *J. For. Res.* **2**, 59-65 (1997)
6. YADA, H., SATO, H., KANEKO, S. and ICHIHARA, A. : The Structure of Abscisterol A : A Novel 21-Nor- $\Delta^{17(21)}$ unsaturated Sterol from *Cryptosporopsis abietina* Tetrahedron letters **35**, 4393-4396, (1994)
7. YADA, H., SATO, H. and ICHIHARA, A. : The Biogenesis of New Abscisterols and a 21-Oic acid Type Sterol from *Cryptosporopsis abietina* Tetrahedron letters **36**, 7471-7474, 1995
8. C.H.Hassall, and K. Lawrence, : *J. gen. Microbil.*, **35**, 483 (1964)
9. J. A. Ballantine, C. H. Hassall, and B. D. Jones, : *Phytochemistry*, **7**, 1529 (1968)

Isolation, Structural Determination, A Biologically Active Compounds from *Cryptosporopsis abietina*

Michihide MAEKAWA

(Applied Plant Research Center, Japan Tobacco Inc., Oyama 323, Japan)

Aiko SUGAYA and Hiroji SATO

(Research Group of Northern Bioresources and Ecology, Graduate school of Agriculture,

Division of Science of Plant Resources, Experiment Farms, Faculty of Agriculture,

Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan)

(Received January 15, 2001)

Summary

The structure of a biologically active benzaldehyde derivative, produced by *Cryptosporopsis abietina*, was determined to be 2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyde **1** and 2,4,5-trihydroxy-6-methylbenzaldehyde **2**. **2** was a new biologically active compound. The structures of the compounds were determined by spectral analyses.