

イワタイゲキ(*Euphorbia jolkini* Boiss.)の根の抗菌性物質について

著者	東 四郎, 阿部 美紀子, 岩川 哲夫, 長谷 綱男
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要. 地学・生物学
巻	7
ページ	67-73
別言語のタイトル	THE ISOLATION AND PROPERTIES OF ANTIBACTERIAL SUBSTANCE PRESENT IN BOOT <i>Euphorbia jolkini</i> Boiss.
URL	http://hdl.handle.net/10232/5869

イワタイゲキ(*Euphorbia jolkini* Boiss.)の根の抗菌性物質について

著者	東 四郎, 阿部 美紀子, 岩川 哲夫, 長谷 綱男
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要. 地学・生物学
巻	7
ページ	67-73
別言語のタイトル	THE ISOLATION AND PROPERTIES OF ANTIBACTERIAL SUBSTANCE PRESENT IN ROOT <i>Euphorbia jolkini</i> Boiss.
URL	http://hdl.handle.net/10232/00003906

イワタイゲキ (*Euphorbia jolkini* Boiss.) の 根の抗菌性物質について

東 四郎*・阿部美紀子*・岩川哲夫**・長谷綱男**

1974年 9月 30日 受理

THE ISOLATION AND PROPERTIES OF ANTIBACTERIAL
SUBSTANCE PRESENT IN ROOT *Euphorbia jolkini* Boiss.

by

Shiro Higashi*, Mikiko Abe*, Tetsuo Iwagawa** and Tsunao Hase**

Abstract

Antibacterial substance has been isolated from the root of *Euphorbia jolkini* Boiss. (*Euphorbiaceae*), which had been used as fish-poison plant at Tairajima in the Satsunan Islands. This paper describes the isolation method and chemical characteristics of the pure crystalline antimicrobial substance together with the results of studies designed to elucidate the structure of the compound. We have identified the compound as methyl gallate. It was found that methyl gallate has more effective antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Rhizobia* and *Vibrio parahaemolyticus* than gallic acid and other 6 species of phenolic compounds.

緒 言

植物の組織中に抗菌性を有する物質の存在することはよく知られている事実である。⁽¹⁾ 傷痕部分からの病原菌の侵入防除, 感染菌に対する抵抗性などの観点から考えるとその存在理由はうなずける。近年, 特に病原菌の感染により抗菌性物質 (antimicrobial substance) が植物組織中に誘導される現象は, 生理化学的立場から重要視されている (phytoalexin 類)。⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾ また, 生薬学的にも植物組織中に存在する抗菌性物質は古くからの研究テーマである。

我々は数多くの植物の中から有効な抗菌物質を含む植物をスクリーニングする手段として, 薩南諸島に伝承されている有用植物について集録し, その中から可能な限りの植物をメタノール抽出し, 細菌類 8 種, 糸状菌類 6 種, 酵母類 2 種についてその抗菌性を調べた。今回はそれらの植物のうち, トカラ列島平島で魚毒植物として用いられていた イワタイゲキ (*Euphorbia*

* Department of Biology, Faculty of Science, Kagoshima University, Kagoshima

** Department of Chemistry, Faculty of Science, Kagoshima University, Kagoshima

jolkini Boiss., 方名ヤギクサ, 日本の暖帯の海浜に自生するトウダイグサ科の植物) のメタノール抽出物が抗菌性を示すことを認め, その抗菌成分の分析を行い, その結果, この成分が methyl gallate であることを確認した。さらに methyl gallate と gallic acid, 及び植物中に普遍的に含まれていると思われるフェノール性化合物との抗菌力の比較を行った。

実験及び結果

(1) 材料植物 イワタイゲキ (*Euphorbia jolkini* Boiss.), 1974年5月, 鹿児島県 肝属郡佐多町で採集。

(2) 活性測定に用いた菌種及び培養 細菌類 : *Escherichia coli* B, *Bacillus subtilis* IFO 3007, *Staphylococcus aureus* AHU 1537, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080, *P. fluorescens* IFO 3081, *Rhizobium trifolii*, *R. leguminosarum*, *Vibrio parahaemolyticus*。糸状菌類 : *Hormodendrum* sp. (イネより分離), *Pellicularia sasakii*, *P. filamentosa*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Aspergillus niger* ATCC 6275。酵母類 : *Saccharomyces cerevisiae* IFO 2193, *Sacch. rouxii* OUT 7133。

細菌類の培養 : *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *V. parahaemolyticus* 以上は pepton agar にて 37°C, *R. trifolii*, *R. leguminosarum* は mannitol—yeast medium⁽⁶⁾ で 28°C, 酵母類は, Henneberg medium の saccharose 量を 1/10 に減じたものを用い 30°C で培養, 液体培養は 以上の培地から agar powder を除いて培地とした。糸状菌類の培養は Czapeck medium で 30°C にて静置培養した。

(3) 抗菌試験の手技 細菌類及び酵母類は液体培地で回転培養 (30 rpm, 18 hrs) したものを, 重層寒天法にて 1.5% 寒天平板上に拮げた後, 被験液を浸し乾燥させた直径 5 mm のろ紙ディスクを平板上に置き適温で培養した。20—40 時間培養した後, 阻止リングの有無を観察し, その大きさ (半径) を計測した。糸状菌類は, 寒天平板の中央に菌糸を接種し, 適温で培養, 生長した菌糸の先端部分を滅菌コルクボウラー (直径 5 mm) でうちぬき, このブロックを別の寒天平板中央に置いて培養を続けた。移植された平板上で菌糸が 2 cm 位のびた時, 被験液を浸し乾燥させたろ紙ディスクを菌糸先端の外側に置き培養した。2—3 日後, 菌糸の生長阻止の有無を判定した。

(4) 抗菌成分の抽出及び精製 イワタイゲキの根 1.8 kg を水洗後細かに砕き, メタノール 5 liter にて還流冷却管を付し 70—75°C で 10 日間抽出, メタノール可溶性フラクションよりエバポレーターにてメタノールを留去, 残渣を真空デシケーター中で乾固させた。

乾固物 500 mg を 1.5 ml のクロロホルムに懸濁, これを Silicic acid (Mallinckrodt Chemical Works 製) のカラム (2.0×35 cm) で, メタノール : クロロホルムの混液 (CHCl₃, 1, 5, 10, 20% MeOH-CHCl₃, MeOH) で stepwise elution を行い, 各フラクションを濃縮して, (3) に述べた方法で抗菌試験を行った (Fig. 1)。Indicator には *E. coli*, *B. subtilis*, *Sacch. cerevisiae* を用いた。

その結果, *E. coli* に特に有効なフラクションが 5% MeOH-CHCl₃ 部 (Fig. 1 の斜線部分) に出現したのでこの部分についてさらに精製し, 有効成分の結晶化を試みることにした。

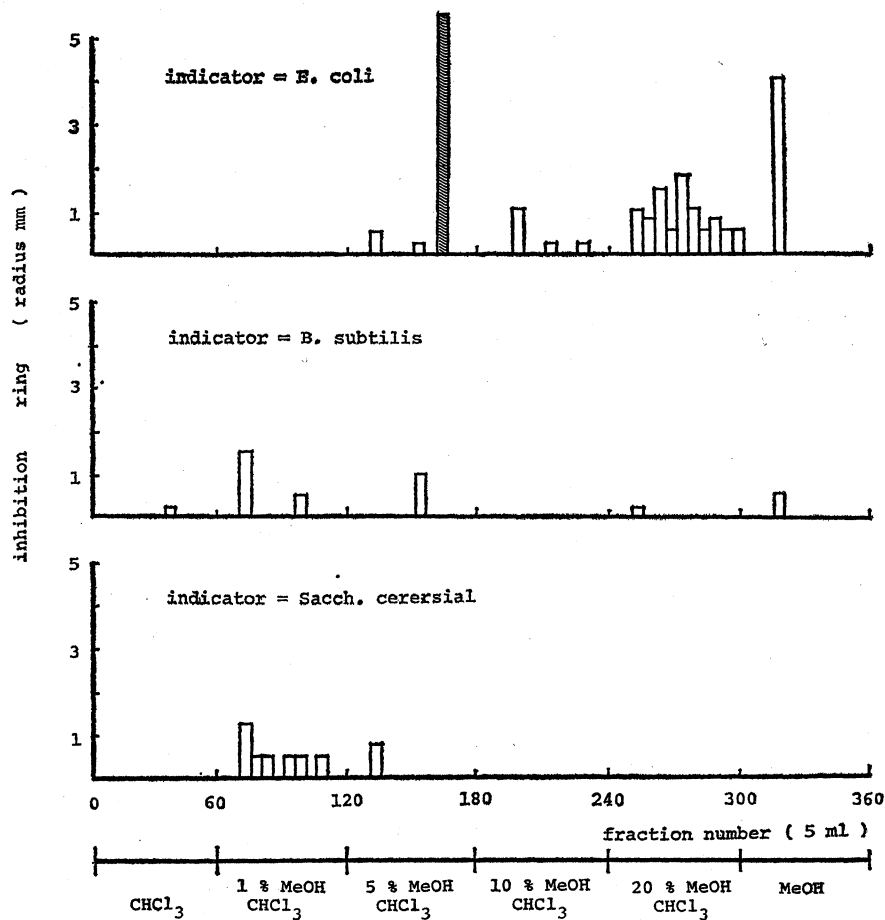


Fig. 1 Elution diagram of antimicrobial substances on Silicic acid column

Fractionation was used stepwise elution method by mixing solution of methanol and chloroform (CHCl_3 , 1, 5, 10, 20% MeOH- CHCl_3 , MeOH). Each tubes were evaporated at 80°C and residues were dissolved with 0.1 ml methanol again. Air dried paper disks, which had been dipped in this methanol solution, were placed on the surface of microbial inoculated medium. After overnight cultured, growth inhibition rings were measured.

Bed dimensions : $2 \times 35\text{cm}$. Sample : 1.5 ml containing about 500 mg desiccated sample. Flow-rate : 10 ml / hr. Indicator : *E. coli*, *B. subtilis*, *Sacch. cerevisial*.

5%MeOH- CHCl_3 フラクションの有効部分を集め、Sephadex LH-20のカラム ($0.8 \times 30\text{cm}$) で1mlフラクションのクロマトグラフィーを行ったところ38—47mlの部分に活性ピークを得た (Fig. 2)。このフラクションを集め、ベンゼン:クロロホルムの混合溶媒を用いて結晶化した。収量はイワタイゲキの根の生鮮重量 1.8 kgより約50mgを得た。

(5) 抗菌成分の構造決定 得られた結晶は 5% MeOH- CHCl_3 で TLC を行い、ヨード蒸気及び 3%塩化第二鉄による発色で単一のスポットであることを確認した後、以下に述べる方法

Indicator	<i>B. subtilis</i>					<i>Staph. aureus</i>				
mg / ml	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100
methyl gallate	—	—	—	—	—	—	—	2.6	7.8	9.0
salicylic acid	—	—	2.6	3.5	4.0	—	—	—	3.0	3.8
protocatechuic acid	—	—	—	3.3	4.0	—	—	—	—	2.8
gallic acid	—	—	—	2.8	3.4	4.0	7.5	11.8	16.0	16.5
<i>o</i> -coumaric acid	—	—	—	3.0	3.3	—	—	—	—	—
<i>p</i> -coumaric acid	—	—	—	2.6	3.0	—	—	—	—	—
caffeic acid	—	—	—	—	—	5.8	6.5	10.5	13.0	13.8
chlorogenic acid	—	—	—	—	2.9	—	—	2.6	5.0	7.0

Indicator	<i>R. trifolii</i>					<i>R. leguminosarum</i>				
mg / ml	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100
methyl gallate	—	2.6	3.0	9.0	10.5	—	—	3.5	7.0	10.0
salicylic acid	—	2.6	3.0	3.5	6.0	—	—	3.0	3.5	6.0
protocatechuic acid	—	—	—	3.0	3.5	—	—	—	3.0	3.8
gallic acid	—	—	—	2.6	3.0	—	—	—	2.6	2.9
<i>o</i> -coumaric acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> -coumaric acid	—	—	2.6	3.0	3.5	—	—	—	4.0	6.0
caffeic acid	—	—	—	2.6	3.0	—	—	—	—	—
chlorogenic acid	—	—	—	—	2.8	—	—	—	2.6	2.8

Indicator	<i>Sacch. cerevisial</i>					<i>Sacch. rouxii</i>				
mg / ml	5	10	20	50	100	5	10	20	50	100
methyl gallate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
salicylic acid	—	—	3.3	3.8	4.0	—	—	3.3	4.0	4.5
protocatechuic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
gallic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>o</i> -coumaric acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>p</i> -coumaric acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
caffeic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
chlorogenic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 1 Microbial growth inhibition test of methyl gallate and seven species of phenolic compounds

The test was performed with a paper disk method. The filter paper disks (5mm in diameter) were dipped into material dissolving methanol solution (5, 10, 20, 50 and 100 mg/ml) of a time and were dried in air. And then, these paper disks were placed on surface of the microbial inoculated plate. After 20—40 hrs culture, the inhibition rings were measured. A radius of inhibition ring was expressed in milimeter with numbers in this table. Non inhibition is denoted by —.

験の方法及び使用した菌種のうち、細菌類に対しては methyl gallate が *B. subtilis*, *S. aureus* を除いて常に他のフェノール性化合物より強い抗菌性を示すことが判明した。また、酵母類に対しては salicylic acid のみが高濃度でわずかに抗菌性を示したにすぎず、糸状菌に対する試験では、すべての化合物が活性を示さなかった。

考 察

薩南諸島における伝承的利用植物について抗菌性にのみ焦点をしばって検討を進めたところ、魚毒植物と称せられている25種の植物の中に、抗菌性を保有するものが高頻度に存在することが判明した。⁽⁷⁾ 一般に魚毒植物は抗カビ性を示すものが多く、抗細菌性を示すものは少ない。しかし、その中でイワタイゲキは抗細菌性のみを有する特殊な植物であった。そこでイワタイゲキに含まれている抗菌成分の分析を行ったところ、*E. coli* に対して最もよく効力を発揮する部分が methyl gallate であることが判明した。

植物中に存在するフェノール性化合物の抗菌作用については、江川が⁽⁸⁾ *Eucalyptus gunii* から gallic acid を単離し、抗菌性を証明している。また、LITTLE 等は⁽⁹⁾ *Haematoxylon campechianum* より ethyl gallate を分離し、その *Mycobacterium tuberculosis* に対する抗菌力を他の gallic acid の誘導体と比較検討している。chlorogenic acid, caffeic acid については KUC 等の⁽¹⁰⁾ 抗カビ性の報告があり、KIRKHAM 等は⁽¹¹⁾ *o*-coumaric acid が *Venturia inaequalis* の孢子発芽を阻止することを観察しており、しかも、isobutyl *o*-coumarate 等、*o*-coumaric acid の ester が効果的に発芽阻止を行うと述べている。⁽¹²⁾ このようにフェノール性化合物の抗菌性は catechol, protocatechuic acid, orcinol などとともに古くから注目されている。⁽¹³⁾

一方、methyl gallate については藤井が⁽¹⁴⁾ *Euphorbia humifusa* Willd. から、また、藤川等が⁽¹⁵⁾ *Geranium onoei* Frank et Sav. から植物の一成分として単離しており、必ずしも非常に特殊に存在する物質ではない。

Methyl gallate の抗菌力は、他の植物に普遍的に存在するフェノール性化合物に比較して、*E. coli* に対しては非常に顕著な作用を示す (Table 1) が、糸状菌、酵母に対しては全く作用を示さなかった。また、gallic acid は *B. subtilis*, *S. aureus* に対しては methyl gallate より有効阻止能力があるが、他の細菌類に対しては methyl gallate の方が強い効力を示している。methyl 基の付加が細菌細胞の生理活性のどの部分を阻害しているのかについての追求が必要であるように思える。

結 語

1. イワタイゲキの根をメタノール抽出し、その抗菌性を調べたところ、*Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* に強い抗菌力を持つ物質を分離し、この物質が methyl gallate であることを決定した。
2. Methyl gallate と、植物に普遍的に存在するフェノール性化合物の細菌類8種、糸状菌類6種、酵母類2種に対する抗菌力を比較したところ、糸状菌には全く抗菌性を示さず、酵母には salicylic acid がわずかに抗菌性を示し、また、細菌類の *B. subtilis* と *S. aureus* 以外では methyl gallate が他の化合物に比べてかなり強い抗菌力を有することを観察した。

文 献

- 1) 小清水弘一 : 第9回植物化学シンポジウム講演要旨, 16—24 (1973).
- 2) T. S. Sadasivan : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **12**, 449—468 (1961).
- 3) E. G. Bollard and R. E. F. Matthews : *Plant Physiology*, **4B**, 417—550 (F. C. Steward, Ed., Academic Press)(1966).
- 4) L. A. Hadwiger, S. L. Hess and S. von Broembsen : *Phytopathology*, **60**, 332—336 (1970).
- 5) 鈴木直治 : *科学* **40**, 122—128 (1970).
- 6) C. L. Valera and M. Alexander : *J. Bacteriol.*, **89**, 1134—1139 (1965).
- 7) 東四郎, 阿部美紀子, 岩川哲夫 : 鹿児島大学理学部紀要, **8**, 掲載予定.
- 8) 江川宏 : *植物防疫*, **26**, 221—223 (1972).
- 9) J. E. Little, M. W. Foote, W. J. Rogers and D. B. Johnstone : *Antibiotics and Chemotherapy*, **3**, 183—191 (1953).
- 10) J. Kuć, R. E. Henze, A. J. Ullstrup, and F. W. Quackenbush : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3123 (1956).
- 11) D. S. Kirkham and A. E. Flood : *J. Gen. Microbiol.*, **32**, 123—129 (1963).
- 12) D. S. Kirkham and L. D. Hunter : *Ann. Appl. Biol.*, **55**, 359—371 (1965).
- 13) C. H. Fawcett and D. M. Spencer : *Ann. Rev. Phytopathol.*, **8**, 403 (1970).
- 14) K. Huzii, H. Huzikawa and Y. Kondo : *J. Pharm. Soc. Japan*, **57**, 140—143 (1937).
- 15) H. Huzikawa and M. Ina : *Ibid.*, **60**, 125—127 (1940).