

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

川村 倫子

題 目

ヤマグワ抽出成分オキシレスベラトロールの木材腐朽菌メシマコブに及ぼす抗菌作用

( Anti-fungal activity of oxyresveratrol extracted from yamaguwa (*Morus bombycis*) against wood-rotting fungi meshimakobu (*Phellinus linteus*) )

タバコウロコタケ科キノコブタケ属のメシマコブは、近年高い抗腫瘍活性をもつことが注目されているきのこである。このメシマコブは、本邦産材の中では最も耐久性の高いヤマグワの心材腐朽菌とされているが、ヤマグワの心材には強力な抗菌成分、オキシレスベラトロール (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) が存在していることが知られている。そこで本研究では、メシマコブが耐久性の非常に高いヤマグワ心材で繁殖する理由を、他の数種の木材腐朽菌との相互作用という観点から検討し、さらにオキシレスベラトロールのメシマコブと他の木材腐朽菌に対する抗菌作用の違いを、その化学構造と作用機作の両面から比較検討した。

メシマコブの菌糸成長をヤマグワの心材と辺材、ブナおよびクヌギ木粉を用いて、他の数種の木材腐朽菌と比較検討した。その結果、メシマコブは、ブナ、クヌギおよびヤマグワ辺材では白色腐朽菌のカワラタケ、シイタケ、褐色腐朽菌のオオウズラタケなどと比較してかなり成長が劣り、1つの培地で対峙培養すると、これらの他の腐朽菌により容易に侵略され、駆逐された。しかし、抗菌物質オキシレスベラトロールを多量に含有するヤマグワ心材では、メシマコブはあまり大きな影響を受けなかったが、他の腐朽菌はその成長が著しく抑制され、対峙培養した際にはメシマコブは他の腐朽菌と同等かそれ以上の成長をした。したがって、メシマコブはオキシレスベラトロールが高濃度に充填されたヤマグワ心材部では他の腐朽菌と対等もしくは優位に競争できるものと考えられた。

木材腐朽菌に対するオキシレスベラトロールと他のフェノール、二価および三価のポリフェノール類およびレスベラトロールの抗菌活性を測定し、それらの構造と抗菌活性との関連を検討した。その結果、スチルベンの2位のヒドロキシル基の存在がオキシレスベラトロールの木材腐朽菌に対する抗菌活性に大きく寄与していることが明らかとなった。さらに、オキシレスベラトロールの抗菌活性の作用機作を推定するために、抗酸化活性、溶血活性、タンパク質変性活性を他のフェノール類と比較し、菌糸体の電子顕微鏡観察を行った。その結果、オキシレスベラトロールはその溶血活性が他のフェノール類よりも高いため、木材腐朽菌の膜構造を攪乱して菌糸に損傷を与え、菌糸成長を著しく阻害するものと考えられた。一方、メシマコブに対する阻害活性が比較的小さいのはオキシレスベラトロールに対するメシマコブの細胞壁の感受性が他の腐朽菌より低いためと推定された。

以上の検討より、メシマコブは成長が遅く、競争力が弱いいため、強力な抗菌物質オキシレスベラトロールに対する抵抗性を獲得することによって、他の木材腐朽菌が容易に進入できないヤマグワ心材で繁殖することができるのではないかと思われた。また、オキシレスベラトロールがもつ高い抗菌活性は、オキシレスベラトロールの強い細胞壁攪乱作用に起因すると考えられた。

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	TOMOKO KAWAMURA
題 目	Anti-fungal activity of oxyresveratrol extracted from yamaguwa ( <i>Morus bombycis</i> ) against wood-rotting fungi meshimakobu ( <i>Phellinus linteus</i> ) (ヤマグワ抽出成分オキシレスベラトロールの木材腐朽菌メシマコブに及ぼす抗菌作用)
<p>It has been still unknown why meshimakobu (<i>P. linteus</i>) is usually found in yamaguwa, which is one of the most resistant woods to decay in Japan. Therefore, interactions between meshimakobu and some other wood-rotting fungi were mainly investigated in heartwood of yamaguwa which had the powerful anti-fungal substance. Characteristic of anti-fungal activity of oxyresveratrol was also investigated through the chemical structure and the function mechanism.</p> <p>The mycelial growth of meshimakobu compared with those of some other wood-rotting fungi in wood meal media of heartwood and sapwood of yamaguwa, buna and kunugi. The mycelial growth of meshimakobu was not different so much among yamaguwa sapwood, buna and kunugi wood. However, the growth of fungi such as kawaratake (<i>Coriolus versicolor</i>), shiitake (<i>Lentinula edodes</i>) and ouzuratake (<i>Fomitopsis palustris</i>) except meshimakobu was significantly depressed in yamaguwa heartwood which contained antifungal substance, oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) at high level. Taken together, the results strongly suggest that meshimakobu was able to successfully protect the colony against invasion by other fungi only in heartwood of yamaguwa, however, the sterilization should be required for meshimakobu cultivation in buna or kunugi to eliminate other competitive fungi.</p> <p>The anti-fungal activities of oxyresveratrol against meshimakobu and kawaratake of the white-rotting fungi, and ouzuratake of the brown-rotting fungus, were compared with those of phenol, polyphenols and resveratrol in relation to their chemical structures. The results indicated that a hydroxyl group in the 2 position of oxyresveratrol seemed to play a critical role in exerting the inhibitory effect on the mycelial growth of wood-rotting fungi, especially ouzuratake of the brown-rotting fungus. The anti-fungal activity of oxyresveratrol could be brought about by effective disturbance in the cell wall structure of wood-rotting fungi because of the higher activities of hemolysis and albumin coagulation as compared with other phenols. The shrinkage and callus-like cell aggregate were frequently found in the mycelia of kawaratake and ouzuratake incubated in a liquid media with oxyreveratrol by electron microscope. However, there were few distinct damages in the mycelium of mesimakobu. Almost 50% of oxyresveratrol remained in the culture filtrate even when the mycelia fully covered over the surface of liquid media, suggesting that meshimakobu poorly degraded anti-fungal substance with phenol oxidase like laccase. Therefore, the sensibility of meshimakobu for oxyresveratrol seemed to be lower than those of kawaratake and ouzuratake.</p> <p>From these results, meshimakobu could grow at heartwood of yamaguwa to which other wood-rotting fungi hardly approached, because of its less sensitivity to the anti-fungal activity of oxyresveratrol.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	川村 倫子
審査委員	主査 宮崎大学 教授 目黒貞利
	副査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 鹿児島大学 教授 米田 健
	副査 琉球大学 教授 金城一彦
	副査 鹿児島大学 准教授 服部芳明
審査協力者	
題目	ヤマグワ抽出成分オキシレスベラトロールの木材腐朽菌 メシマコブに及ぼす抗菌作用 (Anti-fungal activity of oxyresveratrol extracted from yamaguwa ( <i>Morus bombycis</i> ) against wood-rotting fungi meshimakobu ( <i>Phellinus linteus</i> ))
<p>タバコウロコタケ科キノコブタケ属のメシマコブは、近年高い抗腫瘍活性をもつことが注目されているきのこである。このメシマコブは、本邦産材の中では最も耐久性の高いヤマグワの心材腐朽菌とされているが、ヤマグワの心材には強力な抗菌成分、オキシレスベラトロール (2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) が存在していることが知られている。そこで本研究では、メシマコブが耐久性の非常に高いヤマグワ心材で繁殖する理由を、他の数種の木材腐朽菌との対峙培養により検討し、さらにオキシレスベラトロールのメシマコブと他の木材腐朽菌に対する抗菌作用の違いを、その化学構造と作用機作の両面から比較検討した。本研究で得られた成果を要約すると以下の通りである。</p> <p>メシマコブの菌糸成長をヤマグワの心材と辺材、ブナおよびクヌギ木粉を用いて、他の数種の木材腐朽菌と比較検討した。その結果、メシマコブは、ブナ、クヌギおよびヤマグワ辺材では白色腐朽菌のカワラタケ、シイタケ、褐色腐朽菌のオオウズラタケなどと比較してかなり成長が劣り、1つの培地で対峙培養すると、これらの他の腐朽菌により容易に侵略され、駆逐された。しかし、抗菌物質オキシレスベラトロールを多量に含有するヤマグワ心材では</p>	

メシマコブはあまり大きな影響を受けなかったが、他の腐朽菌はその成長が著しく抑制され、対峙培養した際にはメシマコブは他の腐朽菌と同等かそれ以上の成長をした。したがって、メシマコブはオキシレスベラトロールが高濃度に充填されたヤマグワ心材部では他の腐朽菌と対等もしくは優位に競争できるものと考えられた。

木材腐朽菌に対するオキシレスベラトロールと他のフェノール、二価および三価のポリフェノール類およびレスベラトロールの抗菌活性を測定し、それらの構造と抗菌活性との関連を検討した。その結果、スチルベンの2位のヒドロキシル基の存在がオキシレスベラトロールの木材腐朽菌に対する抗菌活性に大きく寄与していることが明らかとなった。さらに、オキシレスベラトロールの抗菌活性の作用機作を推定するために、抗酸化活性、溶血活性、タンパク質変性活性を他のフェノール類と比較し、菌糸体の電子顕微鏡観察を行った。その結果、オキシレスベラトロールはその溶血活性が他のフェノール類よりも高いため、木材腐朽菌の膜構造を攪乱して菌糸に損傷を与え、菌糸成長を著しく阻害するものと考えられた。一方、メシマコブに対する阻害活性が比較的小さいのはオキシレスベラトロールに対するメシマコブの細胞壁の感受性が他の腐朽菌より低いためと推定された。

これらの結果より、メシマコブは成長が遅く、競争力が弱いため、強力な抗菌物質オキシレスベラトロールに対する抵抗性を獲得することによって、他の木材腐朽菌が容易に進入できないヤマグワ心材で繁殖することができるのではないかと思われた。また、オキシレスベラトロールがもつ高い抗菌活性は、オキシレスベラトロールの強い細胞壁攪乱作用に起因すると考えられた。

以上のように本論文は、メシマコブが耐久性の非常に高いヤマグワ心材で繁殖する理由を、他の木材腐朽菌との相互作用という観点から検討することにより、従来木材の耐朽性が特定の腐朽菌による単独培養の結果を基に判定していることの問題点を指摘したものであり、意義あるものと評価できる。さらにオキシレスベラトロールの化学構造と作用機作との比較検討により、今後木材腐朽菌に有効な防腐剤を開発する上での有益な知見も明らかにされた。よって、本論文は博士(農学)の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	川村 倫子
審査委員	主査 宮崎大学 教授 目黒貞利
	副査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 鹿児島大学 教授 米田 健
	副査 琉球大学 教授 金城一彦
	副査 鹿児島大学 准教授 服部芳明
審査協力者	
実施年月日	平成20年 6月28日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年6月28日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者

氏名

川村 倫子

[質問 1] 他のフェノール類は試薬を用いているのに、オキシレスベラトロールのみ試薬を用いず、抽出成分を使用しているのはなぜか？ また、抽出したオキシレスベラトロールはどの程度の純度か？

[解答 1] 種々の製薬会社に問い合わせたが、市販のオキシレスベラトロールを手に入れることができなかつたので、ヤマグワから抽出し、熱水から再結晶を繰り返したオキシレスベラトロールを使用した。純度は正確には不明だが、液体クロマトグラフィーの面積の比較からは、99%以上の純度と考えられた。

[質問 2] ヤマグワの心材におけるオキシレスベラトロールの含有率が 70%というのは非常に高いように思うが、これには何か理由があるのか？

[回答 2] ヤマグワは本邦産材ではもともと耐朽性の高い材と知られ、その主たる抗菌物質がオキシレスベラトロールとされてきた。このオキシレスベラトロールは一般にクワ科の植物で多いといわれているが、なぜこのように含有量が高いかは報告もなく不明である。

[質問 3] 試料を高圧蒸気で滅菌する際に、成分が変化してしまっている可能性はないか？

[回答 3] これ以外の方法を用いていないので変化が全くないかは不明である。ただし、ヤマグワ木粉をオートクレーブで滅菌した培地と、予めメタノールで抽出処理した後滅菌した木粉に単離したオキシレスベラトロールを同一濃度となるように再添加した培地とで抗菌活性に大きな差が見られなかつたので、滅菌処理による著しい成分変化は起きていないと考えている。

[質問 4] メシマコブのオキシレスベラトロールに対する感受性が他の腐朽菌と比較して低い理由として具体的にどのようなメカニズムが考えられるか？

[回答 4] 電子顕微鏡による菌糸表面の観察の結果から、細胞膜構造の違いが影響しているだろうと考えている。すなわち、膜構造（膜厚や堅さ）や脂質・たんぱく質の組成が異なることが、感受性の高低を左右している可能性があり、今後、詳細に検討する必要がある。

[質問 5] メシマコブは抗腫瘍活性が非常に高いそうだが、この抗菌活性とオキシレスベラトロールの抗菌活性に関連はあると考えてよいか？

[回答5] 今までにきのこから単離された抗腫瘍性活性成分はいずれも多糖類 $\beta$ -D-グルカンなので、スチルベン化合物オキシレスベラトロールの抗菌活性そのものと抗腫瘍活性には、直接的な関連性はないと考える。この関連性を支持できる知見も今のところ見当たらない。

[質問6] フェノール類、ポリフェノール類という表現をしているが、通常、ポリフェノールとは高分子化合物のみを指すことが多いのではないか。一般的な定義として通るものでも、論文上は中身を厳密に区分して表記すべきでないか。

[回答6] ポリフェノールは多価フェノールとも呼び、芳香族炭化水素の2個以上の水素がヒドロキシル基で置換された化合物のことである。したがって、ヒドロキシル基が二つ以上のものをポリフェノールとよび、1価のフェノールを含めてフェノール類と表現しているので、問題はないと考える。

[質問7] 宿主選択のメカニズムの一例として、非常に興味深い機構を明確に示してもらった。このような研究例は他にもあるのか？

[回答7] 木材腐朽菌を対象とする場合、特定の成長促進物質の作用から宿主選択のメカニズムを解明した例は見られる。しかし、抑制物質に対する種間の感受性の相対的な違い、すなわち競争概念を入れた生態的適地という視点で、特定の菌のアドバンテージを説明した研究は少ないと思う。

[質問8] 抗菌活性のメカニズムを溶血作用とタンパク質の凝集作用で説明していたが、他の物質との関連はないのか？

[回答8] 今回は、タンパク質との関係しか検討していないので、その他については不明である。ただ、フェノール類による抗菌活性が細胞膜の攪乱によると推定するのに、抗菌活性とフェノール類の分配係数との関係、およびフェノール類とアルブミンが1:1の複合体を形成するフェノール濃度との関係が検討されていたので、本研究ではこれを作業仮説として検証した。

[質問9] オキシレスベラトロールの残存率がカワラタケと異なる点について、感受性は低いが積極的に分解しているようにも思えるが、測定時の菌体量の影響が結果に現れている可能性はないか？

[回答9] 菌体の成長が遅いことに加えて菌体重量自体が大きく異なるので、単位菌体量当たりで表現せず、オキシレスベラトロールの培地内の残存率として比較している。