

学位論文要旨

氏名

ファーラ デバ

題目

Leucaena leucocephala から単離されたミモシンの生物活性及び亜熱帯性植物 *Bidens pilosa* からの生物活性物質の同定
(Biological activities of mimosine isolated from *Leucaena leucocephala* and identification of bioactive compounds from subtropical plant *Bidens pilosa*)

植物は農芸化学、食品、化粧品、製薬産業で利用される生物活性物質を豊富に含有する資源である。ギンネムとセンダングサは日本国内、特に沖縄で広く繁殖している熱帯・亜熱帯植物である。これらの植物の間にはセンダングサがギンネムの群落内で多く生育したり、また、センダングサ群落内にもギンネムが頻りに観察されるという特異な現象が見られる。これらの興味深い関係を明らかにするため、ギンネムとセンダングサの生物活性物質の性質を詳しくを調査した。

ギンネムにはミモシン[β -N-(3-hydroxy-4-pyridone)- α -aminopropanoic acid]が含まれているため、多くの植物種に対する強い阻害活性を示す。ミモシンによる植物生長阻害活性を 15 種類の植物で試験をした。試験した植物に含まれるクロロフィルと水分含量を測定した。ミモシンはを除いたすべての植物の幼根に対して 90%の生長阻害を示したが、センダングサの胚軸に対しては他の 15 種類の試験に用いた植物よりも非常に低かった。これらの実験に用いた植物のクロロフィルと水分の含有量はミモシンにより濃度依存的に減少させられた。また、スクリーニングの過程で、センダングサ自体がアレロパシー活性を持っていることを証明した。

センダングサの成分として 15 種類のフェノール化合物を同定した。フェノール化合物は抗酸化、抗菌、アレロパシー、酵素阻害を含む多くの機能を持っている植物二次代謝産物の一種である。さらにセンダングサの抽出物は雑草と菌に対して強い阻害活性を示した。根の抽出物は葉と茎よりも高い活性を示した。Folin-Ciocalteu 法による加水分解の前の測定では茎のフェノール化合物含有量が最大を示した。加水分解後、GC-MS で 13 種類のフェノール化合物を根から同定した。カフェー酸の含有量が検出された物質で最も高かった。同定されたフェノール化合物がセンダングサの阻害活性に関わっているのかもしれない。

チロシナーゼは動植物中のメラニン生成において重要な酵素である。対称としてミモシンとコウジ酸、基質として L-DOPA を用いてキノコのチロシナーゼ阻害活性を調査したところ、酢酸エチル画分が他の画分及び抽出物よりも高い活性を示した。 α -2-トコフェノールを対称として、メタノール抽出物と他の画分を比較したところ、酢酸エチル画分は IC₅₀ 値で 25.2 μ g/ml という強いラジカル消去能を示した。これらの画分に含まれる化合物はフェノール、フラボノイド、ヒドロキシケイ皮酸であることを GC-MS で同定した。フェノール含量が高く抗チロシナーゼ活性があるため、酢酸エチル画分は食品、製薬、化粧品の資源として有用と思われた。

精油はアロマハーブやアロマ植物と呼ばれている植物からの揮発しやすい芳香化合物を含む疎水性液がさまざまに濃縮されたものである。水蒸気蒸留によって得られるセンダングサの葉と花の主な精油性成分を GC-MS で同定した。センダングサには 46 種類の化合物が同定されたが、 β -caryophyllene と τ -cadinene が葉と花それぞれの主要物質であった。葉と花の精油の抗酸化試験を DPPH (IC₅₀ 値、47.5 と 49.7 μ g/ml) と β -カロテン脱色法で行った。グラム陰性菌に対して花の精油の阻害活性はグラム陽性菌よりも著しく高い値を示した。センダングサの精油および水抽出物は抗酸化と抗菌活性を有しており、食品や他の関連産業で保存料としての利用できる可能性がある。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	FARAH DEBA
題 目	Biological activities of mimosine isolated from <i>Leucaena leucocephala</i> and identification of bioactive compounds from subtropical plant <i>Bidens pilosa</i> (<i>Leucaena leucocephala</i> から単離されたミモシンの生物活性及び亜熱帯性植物 <i>Bidens pilosa</i> からの生物活性物質の同定)

Plants are rich source of bioactive compounds which have been utilized in the agrochemicals, food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Leucaena leucocephala* and *Bidens pilosa* are the tropical and subtropical plant which grows abundantly in Okinawa, Japan. There is a peculiar phenomenon between these plants; *Bidens* grows frequently in *Leucaena* colony and in *Bidens* colony *Leucaena* abundance was often observed. To explain these interesting relationships, biological active compounds of *Leucaena* and *Bidens* were investigated in detail. *Leucaena* shows strong phytotoxic activity on many plant species due to the presence of mimosine [β -N-(3-hydroxy-4-pyridone)- α -aminopropanoic acid]. Fifteen kinds of plants were examined by mimosine for its plant growth inhibitory activity. The chlorophyll and water content of those tested plants were also measured. The result revealed that the mimosine showed 90% plant growth inhibitory activity against the radicle of all plant seeds except *Bidens* of which the hypocotyls growth was found lowest by mimosine as compared to other fourteen tested plants. It was observed that the chlorophyll and water content of those tested plants were reduced by mimosine. By the screening process, it could be demonstrated that *Bidens* itself had allelopathic activity. It was observed that fifteen kinds of phenolic compounds were identified *Bidens*. Phenolic compounds are a class of plant secondary metabolites that are involved in many function including antioxidant, antimicrobial, allelopathic and enzyme inhibitors. Moreover, the extract of *Bidens* shows strong phytotoxic action against the growth of weeds and fungi. The extract of roots exhibited higher plant growth inhibitory activity than those of the leaves and stems. Before hydrolysis, a large amount of phenolic compounds was found in stem measured by Folin-Ciocalteu method. After hydrolysis, thirteen kinds of phenolic compounds were identified in roots by GC-MS. The content of caffeic acid was found highest among detected substances. These identified constituents may be responsible for the phytotoxic and fungitoxic activities of *B. pilosa*.

Tyrosinase is a key enzyme in the production of melanin in plants and animals. The inhibitory activities of mushroom tyrosinase using L-DOPA as substrate were investigated where the ethyl acetate fractions showed highest activity among fraction and other extract where mimosine and kojic acids were used as positive control. The ethyl acetate fraction exhibited strongest radical scavenging activity with an IC_{50} value 25.2 μ g/ml, when compared with methanol extract, other fractions and α -tocopherol as positive control. By the GC-MS, phenolic, flavanoid and hydroxycinnamic acid groups of compounds were identified from these fractions. The high phenolic content and anti-tyrosinase activity make the ethyl acetate fraction most competent candidate for food, pharmaceutical and cosmetic products.

Essential oil is a concentrated, hydrophobic liquid having volatile aroma compounds emitted from plants, which are called aromatic herbs or aromatic plants. The major volatile constituents of leaves and flowers of *Bidens* from the essential oil obtained by steam distillation were identified by GC-MS. Forty-six components were identified from *Bidens*, of which β -caryophyllene and τ -cadinene were the main compounds found in leaves and flowers, respectively. Antioxidant activity of leaves and flowers essential oils was carried out by DPPH (IC_{50} 47.5 and 49.7 μ g/ml, respectively) and β -carotene bleaching methods. The inhibitory activity of the flower essential oils in Gram-negative bacteria was significantly higher than in Gram-positive. The essential oils and water extracts of *Bidens* possess antioxidant and antimicrobial activities that might be a natural potential source as preservative in food and other allied industries.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	FARAH DEBA
審査委員	主査 琉球大学 教授 多和田 真吉
	副査 琉球大学 教授 安田 正昭
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 加藤 富民雄
	副査 琉球大学 教授 田幸 正邦
審査協力者	
題 目	Biological activities of mimosine isolated from <i>Leucaena leucocephala</i> and identification of bioactive compounds from subtropical plant <i>Bidens pilosa</i> (<i>Leucaena leucocephala</i> から単離されたミモシンの生物活性及び亜熱帯性植物 <i>Bidens pilosa</i> からの生物活性物質の同定)
<p>ギンネム(<i>Leucaena leucocephala</i>)とセンダングサ (<i>Bidens pilosa</i>) は日本国内、特に沖縄で広く繁殖している熱帯・亜熱帯性の帰化植物である。これらの植物をよく観察するとセンダングサはギンネムの群落内でも生育しており、また、センダングサ群落内にもギンネムが生育しているという特異な共生現象が見られる。本研究では、これらの興味深い関係を明らかにするため、ギンネムとセンダングサに含まれる生物活性物質について詳細な研究を行った。その内容は以下のように要約される。</p> <p>ギンネムにはミモシン[β-N-(3-hydroxy-4-pyridone)-α-aminopropanoic acid]が含まれているため、多くの植物種に対する強い生長阻害活性を示す。ミモシンによる植物生長阻害活性を 15 種類の植物について試験を行ったところ、ミモシンはセンダングサを除いたすべての植物の幼根に対して 90%の生長阻害を示したが、センダングサに対しては他の 14 種類の試験に用いた植物よりも非常に低かった。それらの植物に含まれるクロロフィルと水分含量を測定した結果、クロロフィルと水分の含有量はミモシンの濃度に依存して減少が見られた。また、スクリーニ</p>	

ングの過程で、センダングサ自体がアレロパシー活性を持っていることが明らかになった。

そこで、センダングサの成分として 15 種類のフェノール化合物を同定し、さらにセンダングサの抽出物は雑草と植物病原菌に対して強い生育阻害活性を示すことを明らかにした。フェノール化合物の含有量は茎が最大であったが、根の抽出物は葉と茎の抽出物よりも高い阻害活性を示した。加水分解処理後、GC-MS により 13 種類のフェノール化合物を根の抽出物から同定し、また、検出された物質の中ではカフェー酸の含有量が最も高いことを明らかにした。

チロシナーゼは動植物中のメラニン生成において重要な酵素である。対照としてミモシンとコウジ酸、基質として L-DOPA を用いてチロシナーゼ阻害活性を調査したところ、センダングサの酢酸エチル画分が他の画分よりも高い活性を示した。また、 α -2-トコフェノールを対照として、メタノール抽出物と他の画分の抗酸化能を比較したところ、酢酸エチル画分は IC₅₀ 値で 25.2 μ g/ml という強いラジカル消去能を示した。この画分に含まれるフェノール性化合物、フラボノイド、ヒドロキシケイ皮酸などの化合物を GC-MS で同定した。酢酸エチル画分にはこれらの生物活性物質が多く含まれることが示唆され、食品、製薬、化粧品天然素材として有用であると思われた。

水蒸気蒸留によって得られるセンダングサの葉と花の精油成分を GC-MS で分析し、46 種類の化合物を同定した。その中では β -caryophyllene と τ -cadinene が葉と花におけるそれぞれの主要物質であった。それら精油の抗酸化試験を DPPH と β -カロテン脱色法で行ったところ、葉と花についての IC₅₀ 値は 47.5 と 49.7 μ g/ml であった。グラム陰性菌に対して花の精油の生育阻害活性はグラム陽性菌よりも著しく高い値を示した。

以上のように、本研究によりギンネムとセンダングサの共生関係が明らかにされ、また、センダングサに含まれる生物活性成分の有効性と天然素材としての有用性も証明されており、本論分は博士の学位論文として十分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	FARAH DEBA
審査委員	主査 琉球大学 教授 多和田 真吉
	副査 琉球大学教授 安田 正昭
	副査 鹿児島大学教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学教授 加藤 富民雄
	副査 琉球大学教授 田幸 正邦
審査協力者	
実施年月日	平成20年1月25日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年1月25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	FARAH DEBA

[質問1] なぜ抗菌活性試験に *Corticium rolfsii* や *Fusarium oxysporum* のような微生物を選びましたか。

[回答1] それらの微生物はトマトや落花生に根腐れ病、そしてアスパラガスに黄化病などの症状を引き起こす植物病原菌だからです。

[質問2] あなたのスライドでセンダングサとギンネムが同じ群落内に共生しているのを見せましたが、この現象について何か情報がありますか。

[回答2] ギンネムのアレロパシー物質であるミモシンはセンダングサ以外の植物は生育を阻害するのに、センダングサだけ阻害しないということに非常に興味を持たれました。ミモシンの植物生育阻害作用のメカニズムとしてクロロフィルの合成を阻害するからだということ突き止めましたが、センダングサのクロロフィルはミモシンに抵抗性を示すために生育阻害されずにギンネム群落内にセンダングサが共生して生育していることが分かりました。

[質問3] クロロフィル合成阻害以外にミモシンの作用メカニズムについて説明してくれませんか。

[回答3] ミモシンは色々な生物の細胞周期をG1段階で停止させることが知られていますが、他にタンパク質合成阻害、核酸合成阻害なども報告されております。

[質問4] あなたは15種類のフェノール化合物を同定しましたが、どの物質が抗菌活性およびチロシナーゼ阻害活性に重要な役割を果たしたのでしょうか。

[回答4] センダングサの葉、莖、根から15種類のフェノール化合物を同定しましたが、多く含まれているカフェー酸が、強い抗菌活性の要因となっています。センダングサの根の酢酸エチル画分はオイゲノールとヒドロキシけい皮酸誘導体がチロシナーゼ阻害活性の要因となっています。

[質問5] チロシナーゼ阻害活性のメカニズムを説明してくれませんか。

[回答5] チロシナーゼは活性部位に6個のヒスチジン残基と2個の銅イオンが結合しており、システインの位置も立体構造を安定させるジスルフィド結合を形成するという重

要な役割を果たしている。酸素分子をチロシンに結合させL-DOPAに変換させ、さらに酸化反応によりメラニン色素を生じ、シミや皮膚ガンにまで発展させることが知られています。

[質問6] チロシナーゼ阻害活性の基質にL-DOPAを使用していましたが、なぜ基質としてチロシンを使用しなかったのですか。

[回答6] メラノサイトではチロシナーゼは二箇所での重要な反応を触媒します。一つ目はチロシンの水酸化、もうひとつはL-DOPAへの酸化反応です。私はチロシナーゼ阻害剤との酸化反応を調べたかったのでL-DOPAを選択しました。

[質問7] 定性および定量した化合物にはどんなものがありますか。

[回答7] 6種類のフェノール性化合物、例えばpurocatechin, p-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillin, p-coumaric acid そしてferulic acidの定量を行いました。

[質問8] センダングサを利用するのにあなたが考案したことは何ですか。

[回答8] センダングサの研究から除草剤と抗菌剤が開発できると思います。センダングサの精油成分に関する研究は報告されていませんでしたが、精油は一般的にも抗菌、抗酸化活性がありますので、医薬や化粧品産業界から大きな関心が持たれるものと思います。

[質問9] あなたは自分の国でセンダングサを見たことがありますか。

[回答9] バングラデッシュは沖縄と同じ亜熱帯の国ですので、センダングサは普通に見ることができます。