

Ageratum conyzoides に含まれる殺線虫活性物質

中島 修平・高石 和人・長野 庸一・アレン ヨハネス
河津 一儀・馬場 直道
(生物資源化学講座)

Nematicidal Compound from *Ageratum conyzoides*

Shuhei Nakajima, Kazuto Takaishi, Youichi Nagano
Yohannes Alen, Kazuyoshi Kawazu, and Naomichi Baba
(Department of Bioresources Chemistry)

Activity-guided chromatographic purification of the methanol extract of *Ageratum conyzoides*, using pine wood nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* successfully led to the isolation and characterization of the nematicidal compound with minimum effective dose (MED) of 75 $\mu\text{g}/\text{cotton ball}$ ($\mu\text{g}/\text{bl.}$). Based on the chemical and spectral properties, the compound was determined to be coumarin (1). The activity of coumarin derivatives (2-5) was also investigated.

Key words : Nematicidal compound; *Ageratum conyzoides*; Coumarin; Cotton ball-fungal mat method; *Bursaphelenchus xylophilus*

緒 言

マツノザイセンチュウを主な要因として、マツが急激に萎凋・枯損するいわゆる「材線虫病」を防除するため、これまでに薬剤をマツ樹幹に注入する方法や、線虫を媒介するマツノマダラカミキリを殺虫剤で駆除する方法などが試みられ、一定の効果をあげてきた。しかし、我が国の一部の地域では、本病の被害は依然としてみられ、さらに拡大する恐れがあるといわれている。従って、より効果的で安全・安価な防除対策の確立が求められている。以前、河津ら^{1,2)}は殺線虫活性物質探索のために、マツノザイセンチュウを用いた簡便な生物試験法を開発した。著者らはこの試験法を使用して、殺線虫活性をもつ天然化合物の探索を行い、これまでいくつかの殺線虫活性物質を得た³⁻⁵⁾。一方、世界には多種多様な植物が自生しており、これらの中には民間伝承薬や天然殺虫剤として使用されてきたものも数多く含まれている。現在まで、これらの成分研究が精力的に行われ、抗腫瘍活性をはじめとする様々な生理活性物質が見出されてきたが、マツノザイセンチュウに対して殺線虫作用を示す植物成分についての研究はあまり行われてこなかった。最近アレンらは、インドネシア産熱帯雨林植物に含まれる殺線虫活性物質の探索を行い⁴⁾、*Knema hookeriana* 樹皮のメタノール抽出物から、活性物質として3種類のメタ置換アルキルフェノールを単離・構造決定した⁵⁾。本研究では、スクリーニングによって活性が認められたキク科植物 *Ageratum conyzoides* のメタノール抽出物に含まれる殺線虫活性成分について検討を行った。その結果、最小有効投

与量 (MED) 75 $\mu\text{g}/\text{dl}$. で活性を示す成分をヘキサン可溶部から単離し、それが coumarin であることを明らかにした。また、各種 coumarin 誘導体について殺線虫活性を調べた結果、7-methoxycoumarin に coumarin より強い活性が認められた。

材料と方法

分析機器および試薬

¹Hおよび¹³C-NMR スペクトルは Varian VXR-300 NMR 測定装置 (300 MHz および 75 MHz), GC/MS スペクトルは日本電子 Automass 20 coupled with GC (HP 5980, capillary column: DB 1, 30m \times ϕ 0.32mm) を用いて測定した。GC 条件は以下の通り。He 流量: 27 ml/min, 注入口温度: 200°C, オープン温度: 70°C (3 min) - 250°C (30 min) 昇温 (10°C/min)。カラムクロマトグラフィーにはシリカゲル (Wakogel C-300, 和光純薬), 薄層クロマトグラフィーにはシリカゲル TLC プレート (Merck, Art.5554, F₂₅₄, 0.25mm) を用いた。Coumarin (Aldrich Chem. Co., 5 g), 4-hydroxycoumarin (2, Sigma, 10 g), 7-hydroxycoumarin (umbelliferone, 4, Merck-Schuchardt, 50 g) は市販品を購入した。

Coumarin 誘導体の調製

4-Methoxycoumarin (3)

4-Hydroxycoumarin (2) 100mg にジアゾメタンエーテル溶液 10ml を加え、一晩攪拌した。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20 g, Hexane: EtOAc =

2 : 1)により精製し, 4-methoxycoumarin (**3**, 29.1 mg)を得た. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ , J , Hz) : 4.00 (3 H, s), 5.70 (1 H, s), 7.33 (1 H, ddd, $J = 8, 7, 1.5$), 7.48 (1 H, dd, $J = 8, 1.5$), 7.55 (1 H, ddd, $J = 8, 7, 1.5$), 7.82 (1 H, dd, $J = 7, 1.5$)

7-Methoxycoumarin (**5**)

7-Hydroxycoumarin (**4**) 20mgにジアゾメタンエーテル溶液 5 mlを加え, 1時間攪拌した. 生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(10 g, Hexane : EtOAc = 1 : 1)により精製し, 7-methoxycoumarin (**5**, 5.5 mg)を得た. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ , J , Hz) : 3.90 (3 H, s), 6.23 (1 H, d, $J = 7$), 6.81 (1 H, dd, $J = 8, 1$), 6.85 (1 H, d, $J = 8$), 7.38 (1 H, d, $J = 8$), 7.63 (1 H, d, $J = 7$)

Ageratum conyzoides

殺線虫活性成分の分離・精製に用いた粗抽出物は, 園芸用に販売されている植物を栽培・増殖して収穫したもの, またはインドネシアで採集されたものをメタノールに浸漬・ろ過して得た.

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*)

マツノザイセンチュウは, 以下のように継代培養し生物試験に用いた. すなわち線虫の生育している培地を(20 mm×20mm)切り出し, 食餌となる灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea* 以下 *B. c.* 菌と略する)が生育している9 cmペトリ皿に移し, 一週間から十日後4℃で保存した. マツノザイセンチュウの食餌として用いた *B. c.* 菌は, 予め乾熱滅菌した5 cmおよび9 cmペトリ皿中に Czapek-Dox agar 改変培地 (NaNO_3 : 2.0 g, K_2HPO_4 : 1.0 g, KCl : 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.01 g, α -D-glucose : 36.0 g, agar : 13.0 g, tap water : 1,000ml)をそれぞれ5 ml, 14ml加えたものを培地とした. 生育した菌を培地ごと(10mm×10mm)切り出し, 2週間毎に新しい培地に移し, 22℃, 暗黒下で培養した.

殺線虫活性試験

河津らにより開発された綿球試験法¹⁾を一部改変して用いた. すなわち, ベールマン法により集めた線虫を含む滅菌水を遠心後(2,000 rpm, 3分間)計数して1,500頭/100 μl に調整し, 線虫懸濁液とした. 次に, 市販の脱脂綿から容量100 μl の綿球を作り, 80℃で40分間乾熱滅菌した綿球に試料溶液100 μl を投与し, デシケーター内で1時間減圧乾燥した. この綿球に線虫懸濁液を100 μl 注入し, *B. c.* 菌が一面に生育した5 cmペトリ皿中央に置いた. 26℃で96時間放置し, 菌の摂食された様子から活性を判断した. 殺線虫活性が強いために, 菌が摂食されず残った場合+, 活性が弱く, 菌が部分的に摂食されている場合±, 活性を示さないため, 菌が摂食し尽くされ培地が剥き出しになった場合-とした. ±の活性が認められた投与量をMED(最小有効投与量, Minimum effective dose)とした.

殺線虫活性成分の分離, 精製

A. conyzoides のメタノール抽出物500mlを減圧濃縮して得られた粗抽出物(3.77 g)に200mlの蒸留水を加え, 順次, ヘキサンおよび酢酸エチルで抽出を行い, ヘキサン可溶部(820mg), 酢酸エチル可溶部(251mg), 水溶部(2,170mg)を得た. このうちMED=6.5mg/bl.の活性を示したヘキサン可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画した. 溶出溶媒はHexane : EtOAc = 50 : 1, 10 : 1, 1 : 1, 0 : 10, EtOAc : MeOH = 1 : 1, 0 : 10(各1,000ml)を使用し, Fr. 1(103mg), Fr. 2(152mg), Fr. 3(317mg), Fr. 4(45mg)を得た. MED=6.5mg/bl.を示したFr. 1を分取TLC(Hexane : EtOAc = 9 : 1)により精製し, Fr. 5(Rf : 0.93, 27.2 mg), Fr. 6(Rf : 0.69, 11.5mg), Fr. 7(Rf : 0.48, 8.3mg), Fr. 8(Rf : 0.29, 11.8mg), Fr. 9(Rf : 0.14, 31.6mg), Fr. 10(Rf : 0, 3.9mg)を得た. 生物試験を行った結果, Fr. 9に活性(MED < 500 μg /bl.)が認められたため, これを分取TLC(Hexane : EtOAc = 3 : 1)によりさらに精製を行い, Fr. 11(Rf : 0.62, 2.0mg), Fr. 12(Rf : 0.48, 6.2mg), Fr. 13(Rf : 0.36, 16.6mg), Fr. 14(Rf : 0, 4.9mg)を得た. この段階でFr. 11からFr. 14まで全ての画分をTLCで調べたところ, 塩化第二鉄呈色反応を示す成分が認められなかったため, フェノール性化合物は含まれていないと考えられた. 生物試験の結果, Fr. 13に活性(MED < 250 μg /bl.)が認められたため, 再度分取TLC(CHCl_3)により分離・精製を行い, 活性物質(**1**, 4.9mg, MED : 75 μg /bl.)を得た. (図1) t_R (min) : 12.36; EIMS m/z (rel. int.%) : 146(M^+ , 62), 118(100), 90(80), 89(80), 74(6), 64(19), 63(48), 62(20), 61(9), 59(10), 51(12), 50(11), 44(10), 39(18), 38(12); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 ; δ , J , Hz) 6.45(1 H, d, $J = 10.5$),

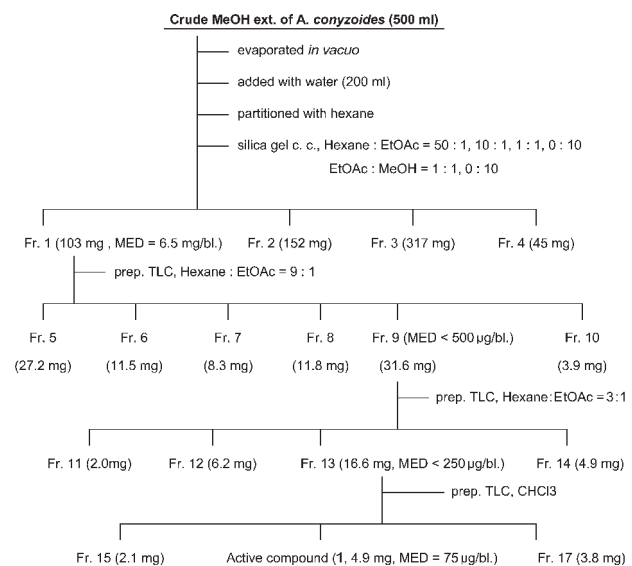


Fig. 1 Isolation of active compound from *A. conyzoides*

7.26 (1 H, dd, $J = 7, 7.5$), 7.33 (1 H, d, $J = 7$), 7.48 (1 H, d, $J = 7$), 7.55 (1 H, dd, $J = 7, 7.5$), 7.70 (1 H, d, $J = 10.5$); ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ) 116.70, 116.90, 118.81, 124.41, 127.84, 131.82, 143.42, 154.04, 160.79.

結果と考察

活性物質 (1) の EIMS スペクトルより分子量は146であり, ^1H -NMR および ^{13}C -NMR の結果とあわせて, 分子式は $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$ であると推測された. ^{13}C -NMR において160.79 ppm にシグナルが認められることより, カルボニル炭素の存在が示唆された. ^1H -NMR スペクトルで $\delta 7.2$ から $\delta 7.6$ までの4つのプロトンが相互にカップリングしていることからオルソ二置換ベンゼン, また隣接している $\delta 6.45$ と $\delta 7.70$ の2つのオレフィンプロトンの存在が考えられた. 以上の結果を総合し, また EIMS スペクトルのライブラリー検索の結果および市販の coumarin の各種機器分析データと比較して, 活性物質 (1) を coumarin であると同定した.

A. conyzoides は熱帯アメリカ原産のキク科植物で, 現在では世界各地の熱帯を中心に, 亜熱帯, 温帯にも分布している多年草である. *Ageratum* 属植物に含まれる生理活性成分としては, anti-JH としての precocene 類⁶⁾ が著名であるが, そのほかにも *A. conyzoides* から, 殺虫活性を示す不飽和分枝脂肪酸が得られている⁷⁾. 一方, coumarin には生物に対する種々の生理作用が認められているが⁸⁻¹⁰⁾, マツノザイセンチュウに対する効果はこれまで明らかではなかった. Coumarin が *A. conyzoides* に含まれる殺線虫活性成分の一つであったことから, 各種 coumarin 誘導体の殺線虫活性についても調べた. 市販品およびその誘導体を用いて1,000 $\mu\text{g}/\text{bl}$. から40 $\mu\text{g}/\text{bl}$. までの8段階で活性の検討を行った. (表と図2) 市販の coumarin の MED は, 天然物と同様75 $\mu\text{g}/\text{bl}$. であった. 4位, 7位にヒドロキシ基が置換した化合物, 4位にメトキシ基が置換した化合物は活性がなくなるか, 著しく弱くなった. しかし, 7位にメトキシ基が置換した化合物は coumarin より活性が強くなり, その MED は40 $\mu\text{g}/\text{bl}$. であった. 置換基の位置と種類により活性が大きく変

化したことは興味深い. このように, coumarin 誘導体の一つが coumarin より若干強い殺線虫活性を示したことから, さらに強い活性をもつ誘導体発見の可能性も期待できる.

要 約

Ageratum conyzoides のメタノール抽出物のうち, ヘキサソ可溶部に殺線虫活性物質の存在が認められたので, シリカゲルカラムクロマトグラフィー, 分取 TLC などによってその活性物質の単離を行った. 得られた活性物質は75 $\mu\text{g}/\text{bl}$. で MED を示した. ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, GC/MS などにより構造解明を行い, 活性物質は coumarin であると同定した. 各種 coumarin 誘導体を用いた生物試験の結果, 7-methoxycoumarin に coumarin より強い活性が認められた.

文 献

- 1) Kawazu, K., Y. Nishii, K. Ishii and M. Tada: A convenient screening method for nematocidal activity. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(3), 631-635 (1980)
- 2) 河津一儀: 生理活性物質のバイオアッセイ (池川信夫ら編), pp. 500-503, 講談社, 東京 (1984)
- 3) Kawazu, K., Y. Nishii and S. Nakajima: Two nematocidal substances from roots of *Cirsium japonicum*. *Agric. Biol. Chem.*, **44**(4), 903-906 (1980)
- 4) Alen, Y., S. Nakajima, T. Nitoda, N. Baba, H. Kanzaki and K. Kawazu: Antinematodal activity of some tropical rain-forest plants against the pinewood nematode, *Bursaphelen-*

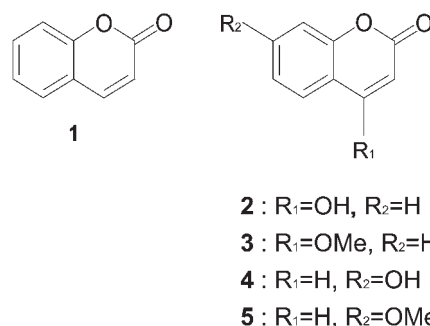


Fig. 2 Structures of coumarin and its derivatives

Table Nematicidal activity of coumarin and its derivatives

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{bl}$.)								MED ($\mu\text{g}/\text{bl}$.)
	1000	500	250	125	100	75	50	40	
1	+	+	+	+	+	±	-	-	75
2	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.a.
3	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.a.
4	±	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	1,000
5	+	+	+	+	+	+	+	±	40

n.t. = not tested, n.a. = no activity

- chus xylophilus*. Z. Naturforsch., **55 c**, 295-299 (2000)
- 5) Alen, Y., S. Nakajima, T. Nitoda, N. Baba, H. Kanzaki and K. Kawazu : Two antinematodal phenolics from *Knema hookeriana*, a Sumatran rainforest plant. Z. Naturforsch., **55 c**, 300-303 (2000)
 - 6) Bowers, W. S. : The juvenile hormones, edited by I. L. Gilbert (Plenum Press, New York) pp. 394 (1976)
 - 7) Pari, K., B. Subrahmanyam, J. N. Rastogi, C. Devakumar and P. J. Rao : Insecticidal (*Z*) - 6 - methyl-12- heptadecenoic acid from the essential oil of *Ageratum conyzoides*. Indian J. Chem., **39 B**, 451-454 (2000)
 - 8) Thorsteinson, A. J. : The experimental study of the chemotactic basis of host specificity in phytophagous insects. Can. Ent. **87**, 49-57 (1955)
 - 9) Gupta, P. D. and A. J. Thorsteinson : Food plant relationships of the diamond-back moth (*Plutella maculipennis* (CURT.)). Ent. exp. and appl., **3**, 305-314 (1960)
 - 10) Nakajima, S. and K. Kawazu : Coumarin and eupoinin, two inhibitors for insect development from leaves of *Eupatorium japonicum*. Agric. Biol. Chem. **44**, 2893-2899 (1980)