

論文内容の要旨

氏名	森 田 泰 弘 <small>もり た やす ひろ</small>			
学位の種類	博士(農学)			
学位記番号	農 第 1 2 5 号			
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 22 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
学位論文題目	青森ヒバ (<i>Thujopsis dolabrata</i> SIEBOLD et ZUCCARINI var. <i>hondai</i> MAKINO) 油に含まれる hinokitiol 関連化合物の生物活性			
論文審査委員 (主査)	教授	坂	上	吉 一
(副主査)	教授	田	中	裕 美
(副主査)	教授	岸	本	憲 明

青森ヒバ(ヒノキ科アスナロ属: *Thujopsis dolabrata* SIEB et ZUCC. var. *hondai* MAKINO)には hinokitiol(I)、 β -dolabrin(II)、 γ -thujaplicin(III)、 α -thujaplicin(IV)ならびに 4-acetyltropolone(V)などの hinokitiol 関連化合物(I-V)が含まれていることが知られている。これら 5 種の hinokitiol 関連化合物(I-V)は、Chart に示すように分子内に tropolone 骨格を有するユニークな化合物である。これらの化合物の中で hinokitiol(I)は、1936 年に野副によって台湾ヒノキ(*Chamacyparis taiwanensis*)から単離された。また、hinokitiol(I)は青森ヒバから抽出された精油(青森ヒバ油)に 1%含まれており、種々の病原微生物に対して強い抗菌活性を示すことがすでに報告されている。Hinokitiol(I)は 1989 年に食品添加物に認可され、その広域な抗微生物活性は保存剤、シャンプー、化粧品および頭髪化粧品に広く利用されている。また、hinokitiol(I)は植物の生長促進作用と共に野菜、花およびマッシュルームの鮮度保持効果も確認されている。

Hinokitiol(I)の上述の作用に関する特許文献が数多く報告されているが、詳細な学術的研究はほとんどされていない。他の hinokitiol 関連化合物(II-V)の生物活性に関しては未だ検討されていない。従って、hinokitiol 関連化合物の生物活性を明らかにするとともに、より有用な生理活性剤を探索する目的で、hinokitiol(I)および β -dolabrin(II)は青森ヒバ材から抽出された青森ヒバ油から単離し、微量成分である α -thujaplicin(IV)および 4-acetyltropolone(V)は化学的に合成した。その結果、著者は hinokitiol 関連化合物(I-V)が以下の生物活性を示すことを明らかにした。すなわち、①抗細菌活性ならびに木材腐朽菌および植物病原真菌を含む抗真菌活性、②金属プロテアーゼ阻害活性、③植物生長阻害活性、④殺シロアリ活性ならびに殺ダニ活性を含む殺虫活性、⑤ヒトおよびマウスの癌細胞に対する細胞障害活性ならびにマウスに対する急性毒性および⑥hinokitiol(I)の *Escherichia coli* IF0 3301 および *Staphylococcus aureus* IF0 12732 に対する殺菌作用機序。①Hinokitiol 関連化合物の抗微生物活性: Hinokitiol 関連化合物(I-V)の抗微生物活性は寒天平板希釈法を用いて検討した。Hinokitiol 関

連化合物(I-V)は6種の病原性グラム陽性菌に対して強い抗細菌活性を示した。特に、 γ -thujaplicin(III)を除いた hinokitiol 関連化合物は *Staphylococcus epidermidis* IFO 12993 (表皮ブドウ球菌) に対して強い抗細菌活性を示し、それらの最小発育阻止濃度(MIC)は 0.39-1.56 μ g/ml であった。

これらの抗細菌活性の強さは標準品として用いた gentamicin(MIC:3.13 μ g/ml)より強かった。*S. epidermidis* IFO 12993 は皮膚の常在菌の一つであることが知られていることから、hinokitiol (I) が本菌に対して強い抗細菌活性を示したことは、この化合物がすでに皮膚殺菌剤として数多く報告されている事実と一致する。また、4-acetyltroplone(V)を除いたこれら4種類の hinokitiol 関連化合物(I-IV)は院内感染症の原因菌の一つである *Enterococcus faecalis* IFO 1296 (腸球菌) に対しても強い抗細菌活性を示し、それらの MIC は 1.56-6.25 μ g/ml であった。*Enterococcus faecalis* IFO 1296 (腸球菌) に対する抗細菌活性は標準品として用いた gentamicin (MIC:6.25 μ g/ml)より強いが、または同等であった。さらに、hinokitiol 関連化合物(I-V)は、有効な抗生物質が少ない Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) および *Legionella pneumophila* Spp. に対しても強い活性を示した。これらの化合物が院内感染細菌の一つである *E. faecalis* IFO1296 および Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) に対して強い抗細菌活性を示したことはかなり興味を持たれる。さらにバンコマイシン耐性球菌(VRE)に対する抗細菌活性も検討すべきである。

次に、hinokitiol 関連化合物(I-V)の抗真菌活性は寒天平板希釈法を用いて検討した。これらの化合物は検討した5種の病原真菌に対して抗真菌活性を示した。その強さは本研究において γ -thujaplicin(III) > β -dolabrin(II) > hinokitiol(I) > α -thujaplicin(IV) > 4-acetyltroplone(V)の順であった。また、植物病原真菌に対して強い抗真菌活性を示した。特に、 β -dolabrin(II)および4-acetyltroplone(V)は *Pythium aphanidermatum* IFO 32440 に対して hinokitiol(I)より強い活性を示した。さらに、 α -thujaplicin(IV)を除く4種の hinokitiol 関連化合物は木材腐朽菌に対してすべて抗真菌活性を示した。特にこれら4

種の hinokitiol 関連化合物は *Daedalea dickinsii* IFO 4979 に対して強い抗真菌活性を示し、標準品と用いた Amphotericin B より強かった。

② 金属プロテアーゼ阻害活性試験：Hinokitiol 関連化合物の carboxypeptidase-A、collagenase、ならびに thermolysin に対する阻害活性を検討した。これらの化合物の中で、hinokitiol(I)および γ -thujaplicin(III)は carboxypeptidase A、collagenase、ならびに thermolysin の金属プロテアーゼに対して強い酵素阻害活性を示した。その中で特に hinokitiol(I)は carboxypeptidase A および thermolysin に対して強い酵素阻害活性を示し、これらの酵素に対する 50% 阻害活性 (IC_{50}) は、それぞれ $2.76 \times 10^{-5} M$ および $6.10 \times 10^{-5} M$ であった。また、 γ -thujaplicin(III)は collagenase に対して強い酵素阻害活性を示し、 IC_{50} は $1.89 \times 10^{-5} M$ であった。標準品として用いた 1,10-phenanthroline より強かった。これらの金属プロテアーゼはリュウマチならびに角膜潰瘍などの炎症の際に、肥満細胞から放出されることが報告されている。5種の hinokitiol 関連化合物がこれらの酵素を阻害した事実から、これらの化合物は抗炎症効果が期待できる。

③ 植物生長阻害活性試験：hinokitiol 関連化合物は *B. campestris* L. (コカブ) ならびに *E. utilis* O_{HWT} et Y_{ABUNO} (ヒエ) の種子に対して強い植物生長阻害活性を示した。中でも V を除く hinokitiol 関連化合物は、これら2種の植物の発芽を 50ppm の濃度で完全に阻害した。これらの化合物の植物生長阻害活性の強さは同濃度において標準品として用いた Sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate と同じ値であった。検討した5種の hinokitiol 関連化合物のうち、 α -thujaplicin(IV)が最も強い植物生長阻害活性を示し、*E. utilis* O_{HWT} et Y_{ABUNO} (ヒエ) に対しては 10ppm の低濃度でも発芽を完全に抑制した。これらの結果は、hinokitiol 関連化合物が植物の発芽の初期に重要な働きをする carboxypeptidase A に対して酵素阻害活性を示した事実から支持できる。次に、これら5種の化合物で処理した *B. campestris* L の幼葉が白色に変化していたため、chlorophyll 含有量を AOAC 法により測定した。その結果、hinokitiol 関連化合物(I-V)で処理した *B. campestris* L の幼葉は対照群に比べて chlorophyll 含量が著しく減少していた。以上の結果から、hinokitiol

関連化合物の植物生長阻害活性の作用機序の少なくとも1つは、クロロフィル合成阻害であることが示唆された。

④殺虫活性試験：hinokitiol 関連化合物の *Coptotermes formosanus* (イエシロアリ) および *Reticulitermes speratus* (ヤマトシロアリ) に対する殺虫活性を検討した。4-acetyltropolone(V)を除いた4種のhinokitiol 関連化合物はこれらのシロアリに対して強い殺虫活性を示し、50%致死濃度(IC₅₀)は、0.02-0.05g/m²の範囲であった。これらの値は標準品として用いた chloropyrifos の IC₅₀ 値の 0.00016g/m² と比較すると極めて弱かったが植物成分としては強い殺虫活性を示した。つぎに、hinokitiol 関連化合物の *Tyrophagus putrescentiae* (ケナガコナダニ) および *Dermatophagoides farinaep* (ケナガコナガダニ) に対する殺虫活性をクリップ法に従い検討した。その結果、 α -thujaplicin(IV) および 4-acetyltropolone(V)を除いた hinokitiol 関連化合物は、これらのダニに対して強い殺虫活性を示し、それらの IC₅₀ はそれぞれ 0.02-0.25g/m² の範囲であった。4-acetyltropolone(V)を除いた hinokitiol 関連化合物は標準品として用いた *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) (LC₅₀:0.66g/m²) より強い殺ダニ活性を示した。

⑤細胞障害活性：Hinokitiol 関連化合物 (I-V) のエールリッヒ腹水ガン、ヒト胃ガン細胞 KATO-III およびマウス白血病 P388 細胞に対する細胞障害活性を試験管内で検討した。5種の hinokitiol 関連化合物は、ヒト胃ガン細胞 KATO-III およびエールリッヒ腹水ガン細胞に対して強い細胞障害活性を示した。特に、 γ -thujaplicin(III) および α -thujaplicin(IV) はヒト胃ガン細胞 KATO-III に対して 0.32 μ g/ml の低濃度で 63% および 75%、エールリッヒ腹水ガン細胞に対しては同濃度で 67% および 43% の増殖阻害活性を示した。これらの細胞障害活性は標準品として用いた podophyllotoxin、vinblastine および vincristine に比べて強かった。一方、4-acetyltropolone(V) は他の 4 種の化合物に比較すると弱い細胞毒性を示したが、20 μ g/ml の濃度では両ガン細胞に対して標準品より強い増殖阻害活性を示した。

次に、5種の hinokitiol 関連化合物のマウス白血病 P388 細胞に対する試験管内の細胞障害活性を検討した。その結果、検討した 5 種の

hinokitiol 関連化合物の細胞障害活性の強さは、 γ -thujaplicin(III) が最も強く、 γ -thujaplicin(III) > α -thujaplicin(IV) > 4-acetyltropolone(V) > hinokitiol(I) > γ -thujaplicin(II) の順であった。特に γ -thujaplicin(III) および α -thujaplicin(IV) は、マウス白血病 P388 細胞に対して 0.63 μ g/ml の濃度 (処理後 48 時間) でそれぞれ 85% および 78% の増殖阻害活性を示し、標準品として用いた vincristine (増殖阻害活性: 75%) より強かった。上述の結果から、これら 5 種の hinokitiol 関連化合物は検討した 3 種のヒトおよびマウスのガン細胞に対していずれも試験管内で強い細胞毒性を示すことが明らかになった。さらに、hinokitiol 関連化合物 (I-V) の毒性を明らかにするために ddY 系雄性マウスを用いて腹腔内投与による急性毒性試験を行った。その結果、これら hinokitiol 関連化合物 (I-V) の急性毒性は低く、それらの半数致死量 (LD₅₀ 値) は、それぞれ hinokitiol(I) は 191.3mg/kg、 β -thujaplicin(II) は 232mg/kg、 γ -thujaplicin(III) は 277mg/kg、 α -thujaplicin(IV) は 256mg/kg、ならびに 4-acetyltropolone(V) は 335.2mg/kg であった。Hinokitiol 関連化合物 (I-V) はかなり低毒性であることが判明した。Hinokitiol 関連化合物 (I-V) の毒性が標準品に比べてかなり低毒性であることから、さらに試験管内における種々のヒト癌細胞を用いた細胞毒性試験およびマウスを用いた *in vivo* 試験は細胞障害活性の作用機序と共に検討すべきである。

⑥Hinokitiol の微生物活性の作用機序：本研究において、著者は hinokitiol(I) および hinokitiol 関連化合物 (II-V) は、種々の病原微生物に対して強い抗微生物活性を示すことを明らかにした。しかしながら、hinokitiol 関連化合物の抗菌活性の作用機序は詳細に調べられていない。従って、これら化合物の抗微生物活性の作用機序を明らかにする前段階として、hinokitiol(I) の *E. coli* IF03301 (大腸菌) および *S. aureus* (黄色ブドウ球菌) IF0 12732 に対する殺菌活性を検討し、形態学変化および生理学的変化から殺菌作用機序を検討した。その結果、hinokitiol(I) の両細菌に対する殺菌作用機序の少なくともひとつは以下の 3 点より菌の呼吸および膜透過を含めた関連する代謝系が I によって強く阻害されたことが示唆された。すなわち、1) hinokitiol(I) の作用を受けた両細

論文審査結果の要旨

菌細胞から、細胞構築の損傷を受けるような大きな変化は観察できなかった（走査型電子顕微鏡による観察）。また、それらの細胞からタンパク質および核酸の漏出も認められなかった。これらの事実から、inokitiol (I) の両細菌に対する殺菌活性と溶菌との直接的な相関は認められなかった。2)、hinokitiol (I) は両細菌の酸素消費を強く阻害した。3)、hinokitiol (I) の作用を受けた両細菌細胞の低分子区分で [U-¹⁴C] 標識-adenine および [U-¹⁴C] 標識-amino acid 混合物の取り込みを著しく抑制した。

Hinokitiol (I) に加え、他の hinokitiol 関連化合物 (II-V) もまた抗微生物活性、金属プロテアーゼ阻害活性、植物生長阻害活性、殺虫活性ならびにヒトおよびマウスのがん細胞に対する *in vitro* における細胞障害活性が認められた。これらの事実は hinokitiol 関連化合物 (I-V) が共通した生物活性を有することを示唆している。したがって、これらの hinokitiol 関連化合物 (I-V) の殺菌作用機序においても類似していると考えられる。さらに、hinokitiol 関連化合物 (II-V) の細菌に対する殺菌作用機序も検討する必要がある。

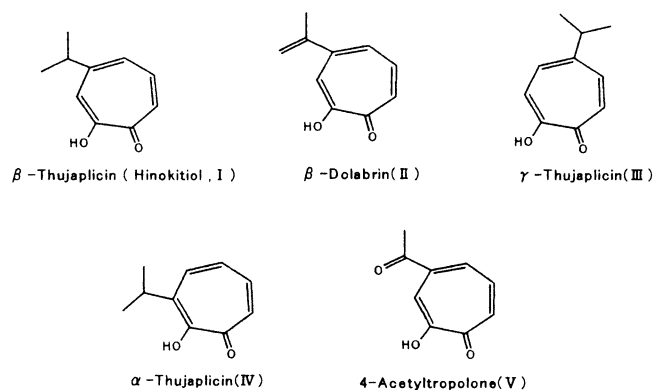


Chart Chemical Structures of Hinokitiol-Related Compounds (I-V) in Aomori Hiba Oil

青森ヒバ（ヒノキ科アスナロ属：*Thujaopsis dolabrata* SIEB *et* ZUCC. var. *hondai* MAKINO）には hinokitiol、 β -dolabrin、 γ -thujaplicin、 α -thujaplicin ならびに 4-acetyltropolone などの hinokitiol 関連化合物が含まれている。Hinokitiol は 1989 年に食品添加物に認可され、その広域な抗微生物活性は保存剤、シャンプー、化粧品および頭髪化粧品に広く利用されている。また、hinokitiol は植物の生長促進作用と共に野菜、花およびマッシュルームの鮮度保持効果も確認されている。Hinokitiol の上述の作用に関する特許文献が数多く報告されているが、詳細な学術的研究はほとんどされていない。また、上述の 4 種の hinokitiol 関連化合物の生物活性に関しては未だ検討されていない。従って、hinokitiol 関連化合物の生物活性を明らかにするとともに、より有用な生理活性剤を探索する目的で、学位申請者は、hinokitiol および β -dolabrin は青森ヒバ材から抽出された青森ヒバ油から単離し、また、微量成分である α -thujaplicin および 4-acetyltropolone を化学的に合成し、「hinokitiol およびその関連化合物の生物活性に関する研究」を精力的に実施し、以下に示す有用な成果を得た。

Hinokitiol およびその関連化合物 (4 種) の抗微生物活性を、寒天平板希釈法を用いて検討した。その結果、Hinokitiol 関連化合物は 6 種の病原性グラム陽性菌に対して強い抗細菌活性を示した。特に、 γ -thujaplicin を除いた hinokitiol 関連化合物は *Staphylococcus epidermidis* IF0 12993（表皮ブドウ球菌）に対して強い抗細菌活性を示し、それらの最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.39-1.56 μ g/ml であった。これらの抗細菌活性の強さは標準品として用いた gentamicin (MIC: 3.13 μ g/ml) より強かった。*S. epidermidis* IF0 12993 は皮膚の常在菌の一つであることが知られていることから、hinokitiol が本菌に対して強い抗細菌活性を示したことは、この化合物がすでに皮膚殺菌剤として数多く報告されている事実と一致する。また、4-acetyltropolone を除いたこれら 4 種類の hinokitiol 関連化合物は院内感染起因菌の 1 つである *Enterococcus faecalis* IF0 12964（腸球菌）に対しても強い抗細菌活性を示し、それらの MIC は 1.56-6.25 μ g/ml であった。また、その抗菌活性は標準品として用いた gentamicin (MIC: 6.25 μ g/ml) より強いが、または同等であった。さらに、hinokitiol 関連化合物は、有効な抗生物質

が少ない Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) および *Legionella pneumophila* spp に対しても強い活性を示した。

② hinokitiol 関連化合物の抗真菌活性を寒天平板希釈法により検討した。その結果、hinokitiol 関連化合物は検討した 5 種の病原真菌に対して抗真菌活性を示した。その強さは本研究において γ -thujaplicin > β -dolabrin > hinokitiol > α -thujaplicin > 4-acetyltropolone の順であった。また、植物病原真菌に対して強い抗真菌活性を示した。特に、 β -dolabrin および 4-acetyltropolone は *Pythium aphanidermatum* IF0 32440 に対して hinokitiol より強い活性を示した。さらに、 α -thujaplicin を除く 4 種の hinokitiol 関連化合物は木材腐朽菌に対しても抗真菌活性を示した。特にこれら 4 種の hinokitiol 関連化合物は *Daedalea dickinsii* IF0 4979 に対して強い抗真菌活性を示し、標準品と用いた Amphotericin B より強かった。

③ Hinokitiol 関連化合物の金属プロテアーゼ阻害活性試験を carboxypeptidase-A、collagenase ならびに thermolysin に対する阻害活性で検討した。その結果、hinokitiol および γ -thujaplicin は carboxypeptidase A、collagenase ならびに thermolysin の金属プロテアーゼに対して強い酵素阻害活性を示した。その中で特に hinokitiol は carboxypeptidase A および thermolysin に対して強い酵素阻害活性を示し、これらの酵素に対する 50% 阻害活性 (IC_{50}) は、それぞれ $2.76 \times 10^{-5} M$ および $6.10 \times 10^{-5} M$ であった。また、 γ -thujaplicin は collagenase に対して強い酵素阻害活性を示し、 IC_{50} は $1.89 \times 10^{-5} M$ であった。これらの値は標準品として用いた 1.10-phenanthroline より強かった。これらの金属プロテアーゼはリウマチならびに角膜潰瘍などの炎症の際に、肥満細胞から放出されることが報告されている。5 種の hinokitiol 関連化合物がこれらの酵素を阻害した事実から、これらの化合物は抗炎症効果が期待できる。

④ hinokitiol 関連化合物の植物生長阻害活性試験を、*B. campestris* L. (コカブ) ならびに *E. utilis* OHWI et YABUNO (ヒエ) の種子に対する効果で評価した。その結果、hinokitiol 関連化合物は強い植物生長阻害活性を示し、中でも 4-acetyltropolone を除く hinokitiol 関連化合物は、

これら 2 種の植物の発芽を 50ppm の濃度で完全に阻害した。これらの化合物の植物生長阻害活性の強さは同濃度において標準品として用いた Sodium 2,4-dichlorophenoxyacetate と同じ値であった。検討した 5 種の hinokitiol 関連化合物のうち、 α -thujaplicin が最も強い植物生長阻害活性を示し、*E. utilis* OHWI et YABUNO (ヒエ) に対しては 10ppm の低濃度でも発芽を完全に抑制した。これらの結果は、hinokitiol 関連化合物が植物の発芽の初期に重要な働きをする carboxypeptidase A に対して酵素阻害活性を示した事実から支持できる。次に、これら 5 種の化合物で処理した *B. campestris* L の幼葉が白色に変化していたため、chlorophyll 含有量を AOAC 法により測定した。その結果、hinokitiol 関連化合物で処理した *B. campestris* L の幼葉は対照群に比べて chlorophyll 含量が著しく減少していた。以上の結果から、hinokitiol 関連化合物の植物生長阻害活性の作用機序の少なくとも 1 つは、クロロフィル生合成阻害であることが示唆された。

⑤ hinokitiol 関連化合物の殺虫活性試験を *Coptotermes formosanus* (イエシロアリ) および *Reticulitermes speratus* (ヤマトシロアリ) を使用し、検討した。その結果、4-acetyltropolone を除いた 4 種の hinokitiol 関連化合物はこれらのシロアリに対して強い殺虫活性を示し、50% 致死濃度 (IC_{50}) は、0.02–0.05g/m² の範囲であった。なお、これらの値は標準品として用いた chlorpyrifos の IC_{50} 値 (0.00016g/m²) と比較すると極めて弱かったが植物成分としては強い殺虫活性を示した。

つぎに、hinokitiol 関連化合物の *Tyrophagus putrescentiae* (ケナガコナダニ) および *Dermatophagoides farinae* (ケナガコナガダニ) に対する殺虫活性をクリップ法に従い検討した。その結果、 α -thujaplicin および 4-acetyltropolone を除いた hinokitiol 関連化合物は、これらのダニに対して強い殺虫活性を示し、それらの IC_{50} はそれぞれ 0.02–0.25g/m² の範囲であった。4-acetyltropolone を除いた hinokitiol 関連化合物は標準品として用いた N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) (LC_{50} : 0.66g/m²) より強い殺ダニ活性を示した。

⑥ エールリッヒ腹水ガン、ヒト胃ガン細胞 KATO-III およびマウス白血病 P388 細胞を使用し、Hinokitiol 関連化合物の細胞障害活性を試験管内で検討した。その結果、5 種の hinokitiol 関連化合物は、ヒト胃ガン細胞

KATO-IIIおよびエールリッヒ腹水ガン細胞に対して強い細胞障害活性を示した。特に、 γ -thujaplicinおよび α -thujaplicinはヒト胃ガン細胞KATO-IIIに対して $0.32\mu\text{g/ml}$ の低濃度で63%および75%、エールリッヒ腹水ガン細胞に対しては同濃度で67%および43%の増殖阻害活性を示した。なお、これらの細胞障害活性は標準品として用いたvinblastineおよびvincristineに比べて強かった。一方、4-acetyltroploneは他の4種の化合物に比較すると弱い細胞毒性を示したが、 $20\mu\text{g/ml}$ の濃度では両ガン細胞に対して標準品より強い増殖阻害活性を示した。

次に、5種のhinokitiol関連化合物のマウス白血病P388細胞に対する試験管内の細胞障害活性の試験では、検討した5種のhinokitiol関連化合物の細胞障害活性の強さは、 γ -thujaplicinが最も強く、 γ -thujaplicin > α -thujaplicin > 4-acetyltroplone > hinokitiol > γ -thujaplicinの順であった。特に γ -thujaplicinおよび α -thujaplicinは、マウス白血病P388細胞に対して $0.63\mu\text{g/ml}$ の濃度(処理後48時間)でそれぞれ85%および78%の増殖阻害活性を示し、標準品として用いたvincristine(増殖阻害活性:75%)より強かった。

上述の結果から、これら5種のhinokitiol関連化合物は検討した3種のヒトおよびマウスのガン細胞に対していずれも試験管内で強い細胞毒性を示すことが明らかになった。さらに、hinokitiol関連化合物の毒性を明らかにするためにddY系雄性マウスを用いて腹腔内投与による急性毒性試験を行なった。その結果、これらhinokitiol関連化合物の急性毒性は低く、それらの半数致死量(LD₅₀値)は、それぞれhinokitiolは191.3mg/kg、 β -thujaplicinは232mg/kg、 γ -thujaplicinは277mg/kg、 α -thujaplicinは256mg/kg、また4-acetyltroploneは335.2mg/kgであった。Hinokitiol関連化合物はかなり低毒性であることが判明した。Hinokitiol関連化合物の毒性が標準品に比べてかなり低毒性であることから、さらに試験管内における種々のヒト癌細胞を用いた細胞毒性試験およびマウスを用いた*in vivo*試験は細胞障害活性の作用機序と共に検討すべきである。

⑦hinokitiol関連化合物の抗菌活性の作用機序は詳細に調べられていない。今回、これら化合物の抗微生物活性の作用機序を明らかにする前段階として、hinokitiolの*E. coli* IFO 3301(大腸菌)および*S. aureus*(黄色ブドウ球菌)IFO 12732に対する殺菌活性を検討し、形態学的変化および生理

学的変化から殺菌作用機序を検討した。その結果、hinokitiolの両細菌に対する殺菌作用機序の少なくともひとつは以下の3点より菌の呼吸および膜透過を含めた関連する代謝系がhinokitiolによって強く阻害されたことが示唆された。すなわち、1) hinokitiol(I)の作用を受けた両細菌細胞から、細胞構築の損傷を受けるような大きな変化は観察できなかった(走査型電子顕微鏡による観察)。また、それらの細胞からタンパク質および核酸の漏出も認められなかった。これらの事実から、hinokitiolの両細菌に対する殺菌活性と溶菌との直接的な相関は認められなかった。2) hinokitiolは両細菌の酸素消費を強く阻害した。3) hinokitiolの作用を受けた両細菌細胞の低分子区分で[U-14C]標識-adenineおよび[U-14C]標識-アミノ酸混合物の取り込みを著しく抑制した。

Hinokitiolに加え、他のhinokitiol関連化合物もまた抗微生物活性、金属プロテアーゼ阻害活性、植物生長阻害活性、殺虫活性ならびにヒトおよびマウスのガン細胞に対する*in vitro*における細胞障害活性が認められた。これらの事実はhinokitiol関連化合物が共通した生物活性を有することを示唆している。したがって、これらのhinokitiol関連化合物の殺菌作用機序においても類似していると考えられる。さらに、hinokitiol関連化合物の細菌に対する殺菌作用機序も検討する必要がある。

以上述べたように、申請者はhinokitiol関連化合物の生物活性を詳細に検討し、有用な活性を有することを見出した。なお、この知見をもとに更なる有用な化合物の探索に応用することが十分可能と判断される。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認められる。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成20年2月8日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。