

ハマスゲ精油成分の抗微生物活性について

駒井功一郎*・佐藤庄太郎*・植木邦和**

Antimicroorganisms Activities of Essential Oil in Purple Nutsedge

Koichiro KOMAI, Shotaro SATO and Kunikazu UEKI

Synopsis

The present investigation was undertaken to the effects of essential oil in purple nutsedge on the microbial activity. The result were as follows:

- 1) The essential oil content in purple nutsedge was high in underground parts. However, the essential oil content changed throughout the growing season. Especially, a remarkable changes was shown in the roots from 30 days to 60 days after planting.
- 2) The essential oil had an antibacterial ability for two typical bacteria used in this test, but it was not active for two species in mold.
- 3) Sesquiterpenes were isolated from essential oil in purple nutsedge such as cyperene, β -selinene, caryophyllene, α -humulene, β -elemene, cyperenone and α -cyperone. α -cyperone and cyperenone strongly inhibited the germination of conidia of *cochliobolus miyabeanus*, but cyperene and β -selinene scarcely affected. Further, α -cyperone and cyperenone also appeared to have inhibitory effect on zoospore germination of *phytophthora infestans* at 5×10^3 M. However, for the three compounds derived from α -cyperone were less active than the parent compound.

I 結 言

ハマスゲ塊茎から分離した精油成分ならびにそれを構成するセスキテルペン類には植物生長抑制作用が認められる。一方それらは根茎部を通して近傍の土壌中に移行して他種植物の生育、発生を阻害するいわゆる植物間相互作用物質として関与していることを既に報告した^{7,8)}。しかし、土壌中に移行した精油成分は他種植物のみならず、土壌微生物や昆虫類に対しても影響をおよぼすことが推察される。

現在提案されているアレロパシーの領域においても単に高等植物相互間での直接的な作用形態のほか、間接的に植物根部と微生物間の相互作用を通して、他種植物に影響を与えているとの知見も多く。例えば、窒素固定バクテリアのように直接植物の生育に関与する微生物に阻害作用を示すような場合⁹⁾、あるいはそれとは逆に分泌物が根周囲の土壌微生物群を増加維持させるいわゆる根圏効果¹⁰⁾もまたその一例といえる。一方これとは別に植物体からの分泌物量が微生物によって増加することも報告され、

植物と微生物の相互作用は多岐にわたっていることが知られている。

ところで、近年ハマスゲ防除の効果を向上させる手段として、除草剤による化学的防除に生態的、生理的特性を組込んだ防除法や微生物や昆虫を利用した生物的方法が提唱されている。特にハマスゲに選択的に寄生する微生物や特異的に食性を示す昆虫を利用する場合、ハマスゲ組織中に含まれる生体成分を介した宿主、寄主間の関係を究明することが必要である。

そこで本報ではハマスゲに含有される精油成分の生体外での作用形態を検討する実験の一環として、特に微生物への影響について若干の検討を行った。ここにその大要を報告する。

II 材料および方法

材料

ハマスゲ塊茎は宮崎県青島で採取したものを供試し、30cm×60cm×30cmのポリ製ポットの中央部に萌芽させた塊茎5個体を植付け、約3ヶ月間育成した後、ハマスゲ植物体の塊茎、根部を含む地下部組織の水蒸気蒸留物から得た主として α -cyperene, β -selinene, cyperenone, α -cyperone の4成分からなる精油を使用した。なお地下部組織中の精油含量の測定には、上記と同様の条件下で栽植したハマスゲを適宜採取して、精油定量装置により分析した。

一方、供試菌はイネごま葉枯病菌、*Cochliobolus miyabeanus* とジャガイモ疫病菌、*Phytophthora infestans* Race Oを除いていずれも発酵研究所より分譲のものを用いた。なお精油からの上記4成分の分離方法は既報⁸⁾に準じた。

α -cyperone 関連化合物の合成

単離した4成分の中で、特に α -cyperone が主体であったので、生理活性と化学構造との関係を把握するために、単離した α -cyperone を用いて関連化合物の合成を実施した。

4 β (H)-eudesman-11-ene-3-one の合成

アセトン-固体炭酸浴で冷却下(-80°C)攪拌しながら200mgの金属ナトリウムを75mlの液体アンモニアに溶解する。その溶液に α -cyperone 200mgを含むエーテル溶液10mlを適加し、30分間攪拌後、1gの塩化アンモニウムを加えて室温に放置し、アンモニアを除去した後、エーテルにて抽出し、活性アルミナカラムクロマトグラフィーと蒸留により精製した。そのIR, NMR, MSの結果は次の通りである。

$[\alpha]_D^{10}$ 16° (C=1.0, EtOH), IR (液膜): 3080cm⁻¹, 1648cm⁻¹, 890cm⁻¹ (ビニリデンオレフィンのC=C, C-H), 1718cm⁻¹ (環状ケトンのC=O), NMR: 0.95ppm (3H, d, J=cps CH₃-C), 1.1ppm (3H, s, CH₃-C), 1.72ppm (3H, s, CH₃-C), MS: M⁺m/e 202, base peak (b. p. と略す) m/e 202.

Eudesman-4-ene-3-one の合成

α -cyperone 300mgのエタノール溶液に10~30mgの白金黒を加えて攪拌しながら16~20時間水素を添加し、反応後蒸留で精製した。そのIR, NMR, MSなどの結果は次の通りである。

$[\alpha]_D^{10}$ 34.8° (C=0.6, EtOH), IR (液膜): 1670cm⁻¹ (α, β 不飽和ケトンのC=O), NMR: 0.92ppm (6H, d, J=7 cps CH₃>C-), 1.16ppm (3H, s, C-CH₃), 1.75ppm (3H, s, CH₃-C), MS: M⁺m/e 220, b.p. m/e 136.

4 β (H)-eudesman-3-one の合成

上記で合成した eudesman-4-ene-3-one を4 β (H)-eudesman-11-ene-3-one の場合と同様な方法で還元し、活性アルミナカラムクロマトグラフィーと蒸留によって精製した。そのIR, NMR, MSなどの結果は次の通りである。

$[\alpha]_D^{10}$ -32.2° (C=0.9, EtOH), IR (液膜): 1718cm⁻¹ (環状ケトンのC=O), NMR: 0.91ppm (6H, d, J=7 cps CH₃>C-), 0.97ppm (3H, d, J=7 cps, CH₃-C), 1.07ppm (3H, s, CH₃-C), MS: M⁺m/e 222, b.p. m/e 222, 以上合成した3成分のIR, NMR, MS および比旋光度は標準品の分析値と一致した。なおこの3成分ならびに α -cyperone の化学構造は Fig. 4 に示した。

微生物抑制試験

胞子発芽試験

PDA 培地で培養したイネごま葉枯病菌から分生胞子を取り、脱イオン水に懸濁させて直ちに発芽試験に用いた。一方、コロジオンで被膜したスライドグラス上に、上記胞子懸濁液0.1mlと界面活性剤糖一脂肪酸エステルにて所定濃度に調整した精油成分の0.1mlを混合したものの一定量を滴下し、27°C、4時間湿潤紙上でのシャーレ中に放置し、0.1%塩化第二水銀溶液の1~2滴下して発芽を固定した後、検鏡により発芽を調査した。

またジャガイモ疫病菌の場合は、ジャガイモ塊茎(品種:ダンシャク)の切片に疫病菌の遊走子を接種し、20°C、5日間培養後、形成された遊走子のうを蒸留水中に懸濁し、1時間、12°Cで放置して遊走子

を水中に遊離させた。次に上記と同様に調製した精油成分の0.5mlと1.6%寒天液0.5mlを80°Cのウォーターバス中に保った試験管で混ぜた後、スライドグラス上に流して固化させたものを検定層とし、この上に遊走子懸濁液の0.03mlを滴下し、湿潤下、25°C、5時間放置して発芽させ、0.1%塩化第二水銀溶液で発芽を固定し、検鏡によって胞子発芽を調査した。

抗菌活性試験

汙紙円ばん法に準じた。すなわち、27°C、10～14日間培養した供試菌の菌糸および胞子を1白金耳とり、5mlの滅菌水に懸濁させて菌浮遊液として、その1mlをPSA培地(45°C～50°C)と混合し、すばやく9cmシャーレに流し込んで検定培地とする。この上面に一定量の精油を含ませた汙紙円ばん(東洋汙紙製ペーパーディスク径8mm)を置き、5°Cで約5時間放置後、27°C、3日間培養して生じた阻止円の径によって活性度を測定した。

塊茎切片の作成

栽植後30日で形成された新塊茎を供試し、凍結ミクロトームにて10 μ の切片を作成した。切片中の精

油の検出には、切片をアニスアルデヒド、酢酸試薬にて反応させて実施した。

III 結果および考察

精油成分の分布状態および生育に伴う変動

塊茎切片の検鏡による精油の分布状態の結果は、plate 1に示す通りである。切片をそのまま検鏡した場合、精油が集積していると思われる黄色の特異的細胞の散在していることが認められる(写真A, C)。この切片をアニスアルデヒド・酢酸試薬に浸漬後、呈色させた場合、黄色細胞は赤色に変化する。呈色細胞は内部随組織、外皮周辺組織ならびに維管束組織中にも認められる。一方、塊茎から水蒸気蒸留によって得た精油は、アニスアルデヒド試薬に対して赤色反応を示すことから、呈色細胞中には精油成分が集積していることが推察される。すなわち、ハマスゲに含有されている精油は、精油を特異的に蓄積しているいわゆる油細胞として存在するものと考えられる。

次にハマスゲの生育に伴う精油量の変化について検討した結果はFig. 1に示すように、精油量は生育

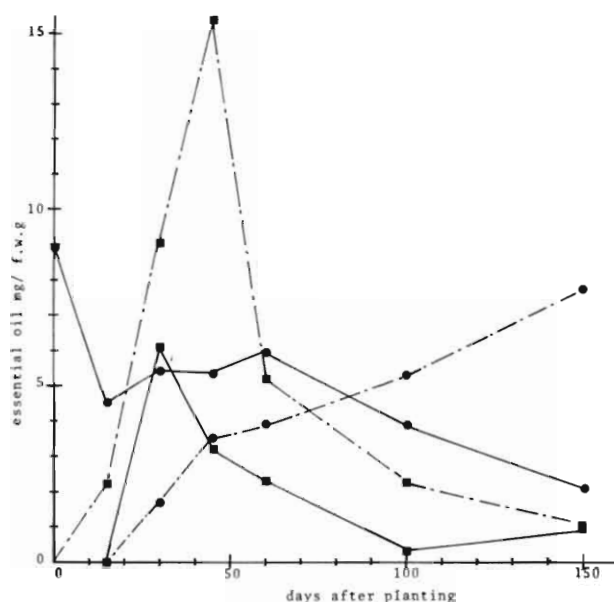


Fig. 1. Change of essential oils during growth of underground part in purple nutsedge.

---■--- root, —■— rhizome,
 ---●--- new tuber, —●— original tuber

とともに変化を示す。特に根部では、生育初期の30日から45日の時期に多量の集積を示すが、塊茎形成が盛んになり、また花序が抽出される45日以後になると急激に低下した。また親塊茎は、育成期間100日程度までは高レベルで維持されているが、その後は急激に消失した。しかし塊茎中の炭水化物や蛋白質などの一次代謝成分に比べてより安定した状態で存在していることが考えられる。一方、形成されてくる新塊茎では、肥大途中の白色塊茎は、肥大終了の褐色塊茎に比較して精油量は低レベルで、成熟化とともに蓄積する傾向を示した。しかし塊茎に結合している地下茎では若い白色地下茎において精油レベルが高く、褐色地下茎では低下した。これらのこ

とより、塊茎組織では長期間精油を蓄積しているが、地下茎や根部では、長期間の集積はなく、常に生体外に排出されていることが考えられる。

精油成分の抗菌活性

ペーパディスク法による精油の抗菌活性の結果をTable 1に示した。供試菌のうち *Fusarium* 属の *oxysporum* および *F. lini* の2種は、1000ppmでも全く抑制を示さず、また *Aspergillus* 属や *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida diddensii* などの酵母ではわずかに活性を示す程度であった。しかし *Bacillus subtilis* や *Escherichia coli* などの細菌類では顕著な生育阻止効果が認められた。

Table 1 Antimicroorganisms activities of essential oil obtained from purple nutsedge by paper disk method.

microorganisms	concentration (ppm)			
	1000	750	500	250
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium lini</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus orizae</i>	+	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	++	+	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	-
<i>Candida diddensii</i>	+	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++	++	-
<i>Escherichia coli</i>	+++	++	++	+

-; inactive, +; active (weak) ++; active (strong), +++; active (very strong)

そこで精油に対する活性を異にする4菌種を供試して、精油構成のセスキテルペン類の活性について検討した。その結果はTable 2に示すように、精油か

ら単離したセスキテルペン7成分のうち、含酸素系の α -cyperone と cyperenone は精油自体では活性を示さなかった *Fusarium* に対して強い抑制を示した。

Table 2 Antimicroorganisms activities of sesquiterpenes isolated from essential oil by paper disk method.

microorganism conc. ppm	Fusarium oxysporum			Fusarium lini			Bacillus subtilis			Escherichia coli		
sesquiterpene	1000	500	100	1000	500	100	1000	500	100	1000	500	100
cyperene	-	-	-	-	-	-	++	+	+	+	+	-
β -selinene	+	-	-	+	-	-	++	+	+	+	+	+
β -elemene	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
caryophyllene	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
α -humulene	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
cyperenone	+	-	-	++	+	-	++	++	+	++	++	++
α -cyperone	++	+	-	++	+	-	+++	+++	++	+++	+++	++

-; inactive, +; active (weak), ++; active (strong), +++; active (very strong)

また細菌類2種についても100ppmで抑制活性が認められることから、これら両成分がハマスゲ精油による抗菌活性の主体成分と考えられた。一方炭化水素系の *cyperene*, β -*selinene*, β -*elemene*, *caryophyllene* および α -*humulene* の5成分は細菌類には若干活性を示すが、前者2成分に比較して低下した。以上のように、ハマスゲ精油による抗菌活性は、微生物フローラあるいは種によって差異が認められた。特に *Fusarium* や *Puccinia canaliculata* はハマスゲ塊茎に寄生し、容易にその組織に侵入するとの知見は²⁾、本実験の *Fusarium* の精油抵抗性と考え合せて興味あるところである。

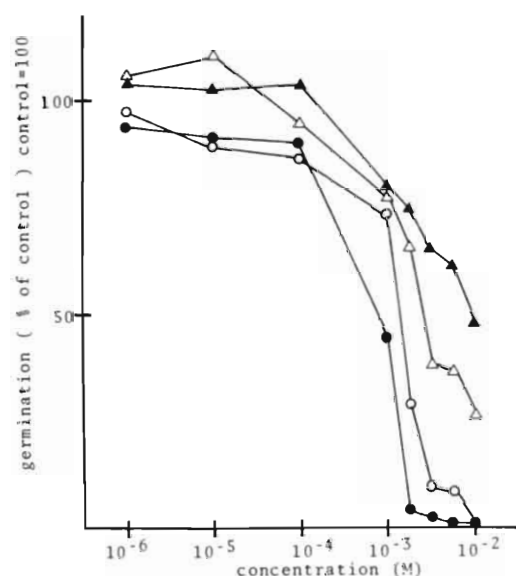


Fig. 2-1. Effect of sesquiterpenes in purple nutsedge on the germination of conidia of *Cochliobolus miyabeanus*.

▲—*cyperene*, △— β -*selinene*,
 ○—*cyperenone*, ●— α -*cyperone*

精油成分の胞子発芽におよぼす影響

微生物の繁殖には胞子形成によって行われるもの、あるいは無胞子酵母のように細胞分裂によるものなど種々あるが、繁殖様式の差異によって精油成分に対する活性も異なることが考えられる。そこでその一端を知る目的で胞子発芽性への影響について、イネごま葉枯病菌ならびにジャガイモ疫病菌について検討した。Fig.2-1 はハマスゲ精油を構成する主なセスキテルペン4成分、*cyperene*, β -*selinene*, *cyp*

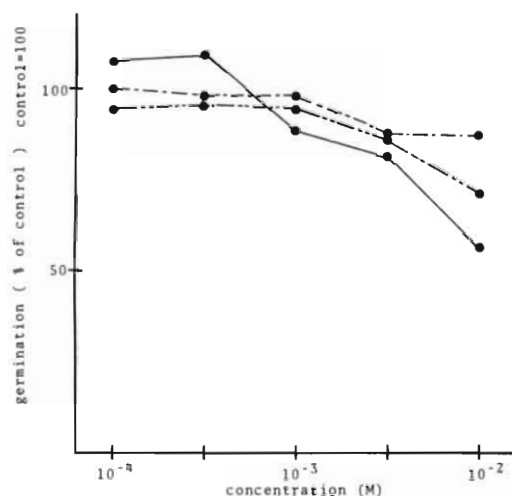


Fig. 2-2. Effect of α -*cyperone* derivatives on the germination of conidia of *Cochliobolus miyabeanus*.

●—4 β (H)-*eudesm*-11-ene-3-one
 ○—4 β (H)-*eudesman*-3-one
 ●—*eudesm*-4-ene-3-one

renone および α -*cyperone* のイネごま葉枯病菌の胞子発芽への影響について検討した結果を示した。Fig. 2-1によれば、含酸素セスキテルペンの α -*cyperone* と *cyperenone* は、 10^{-2} M で胞子発芽を完全に阻止するが、炭化水素セスキテルペンの *cyperene* と β -*selinene* はともに前者2成分に比べて活性は低下した。また Fig. 2-2に示す α -*cyperone* 誘導体3成分の胞子発芽抑制活性では、3成分はいずれも α -*cyperone* に比べて活性低下を示した。

ところで、テルペン類の抑制作用は、主として共役不飽和ケトン基またはラクトン基がその重要な構造因子になっていることが指摘されているが^{1,3,11)}、本結果はそれ以外の不飽和結合もまた抑制発現に関与していることを示した(Fig. 4)。

次にジャガイモ疫病菌の遊走子発芽への影響について検討した結果をFig.3-1とFig.3-2にそれぞれ示した。Fig.3-1は精油構成のセスキテルペン4成分の場合であるが、イネごま葉枯病菌の場合に比較して感受性で、4成分とも 10^{-2} Mで完全阻止を示し、*cyperenone* および α -*cyperone* では 5×10^{-3} Mでも顕著な抑制が認められた。石坂ら⁶⁾はジャガイモ塊茎に罹病するジャガイモ疫病菌は、塊茎組織に生成するフィトアレキシンのリシチンによって阻害され、

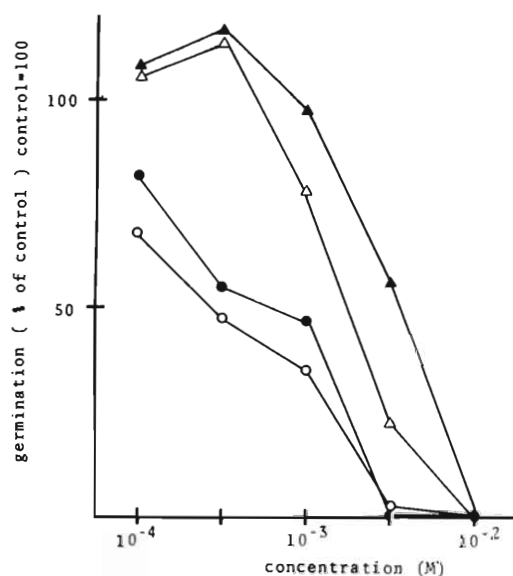


Fig. 3-1. Effect of sesquiterpenes in purple nutsedge on the germination of the zoospore of phytophthora infestans.

—▲— cyperene, —△— β -selinene,
—○— cyperenone, —●— α -cyperone

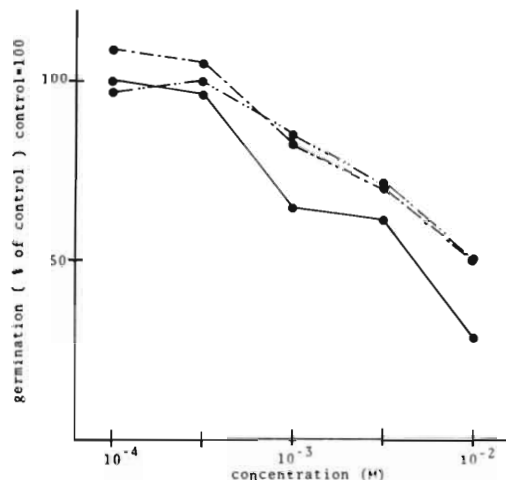


Fig. 3-2. Effect of α -cyperone derivatives on the germination of the zoospore of phytophthora infestans.

—●— $4\beta(H)$ -eudesman-11-ene-3-one
- - - ● - - - $4\beta(H)$ -eudesman-3-one
—●— eudesman-4-ene-3-one

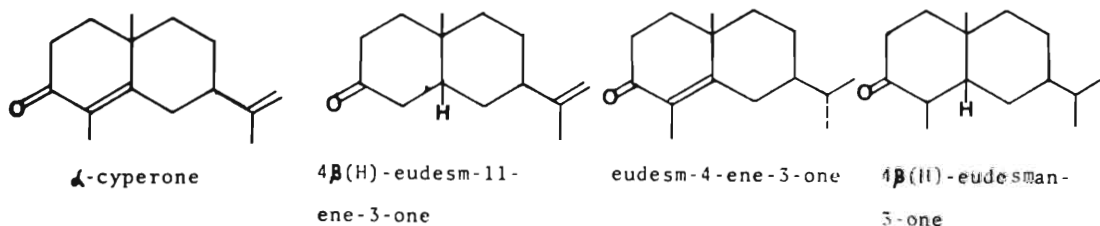


Fig. 4. Chemical structure of α -cyperone and its derivatives.

その発芽管の伸長阻止力は、 ED_{50} で $2.1 \times 10^{-4} M$ であり、またジャガイモ塊茎および葉に対する罹病は $10^{-2} M$ から $3 \times 10^{-3} M$ のリシチン処理で完全に阻止されることを報告している⁵⁾。本実験に供試したセスキテルペン4成分のうち、特に α -cyperoneは上記リシチンと化学構造が類似しており、ハマスゲ精油

における抗菌活性の主成分をなすものと考え、しかしながらFig. 3-2に示す α -cyperone誘導体の場合は、イネごま葉枯病菌と同様、活性低下が認められ、環状不飽和ケトン以外の構造も活性発現に重要な因子であることが認められた。(Fig. 4)

IV 要 約

ハマスゲ精油成分の微生物への影響について若干の検討を行い、ハマスゲ精油成分の生理化学的機能についての基礎的知見を得ようと考えた。

1) 精油成分は塊茎、地下茎、根などの地下部組織に集積されるが、その中で特に根部から生体外へ分泌されることが推察された。

2) ペーパーディスク法によるハマスゲ精油成分の抗菌活性では、*Bacillus subtilis* や *Escherichia coli* などの bacteria は顕著な抑制を示すが、*Fusarium* 属2種では1000ppmでも抑制は認められなかった。

3) ハマスゲ精油を構成する主なセスキテルペン4成分に対する胞子発芽は、イネごま葉枯病菌およびジャガイモ疫病菌とも同傾向を示し、 α -cyperone と cyperenone では発芽は強く阻害されるが、cypene と β -selinene では発芽抑制活性は低下した。また α -cyperone より合成した誘導体、4 β (H)-eudesm-11-ene-3-one, 4 β (H)-eudesman-3-one ならびに eudesm-4-ene-3-one の胞子発芽抑制は、 α -cyperone に比べていずれも活性低下を示した。

本実験を行うに当りイネごま葉枯病菌ならびにジャガイモ疫病菌株の分与いただいた京都大学農学部、山本昌木教授に対し深謝する。

引用文献

- 1) Hayashi, Y., S. Takasdi, H. Ona and T. Sakan : Tetrahedron Letter, 2071 (1968)
- 2) Holm, L. G., D. L. Plucknett and T. V. P.

Pancho : *The world's worst weeds*, distribution and biology 23 (1977)

- 3) 市原耿民・坂村貞雄：化学と生物 14, 78 (1976)
- 4) 石沢修一・鈴木達彦：土壤微生物の生態，共立出版 113 (1973)
- 5) 石坂信之・佐藤章夫・富山宏平：北海道農業試験場彙報 99, 62 (1970)
- 6) Ishizaka, N., K. Tomiyama, N. Katsui, A. Murai and T. Masamune : *Plant & Cell Physiol.* 10(10) 183 (1969)
- 7) 駒井功一郎・植木邦和：雑草研究 24(別号) 111 (1976)
- 8) 駒井功一郎・岩村淳一・植木邦和：雑草研究 22(1), 14 (1977)

- 9) 中山 包：農業および園芸 47(9), 1251 (1972)
- 10) 都留信也：農業および園芸 53(11), 1333 (1978)
- 11) 山下恭平・田中陽光・飯生泰男：植物の化学調節 11, 64 (1976)

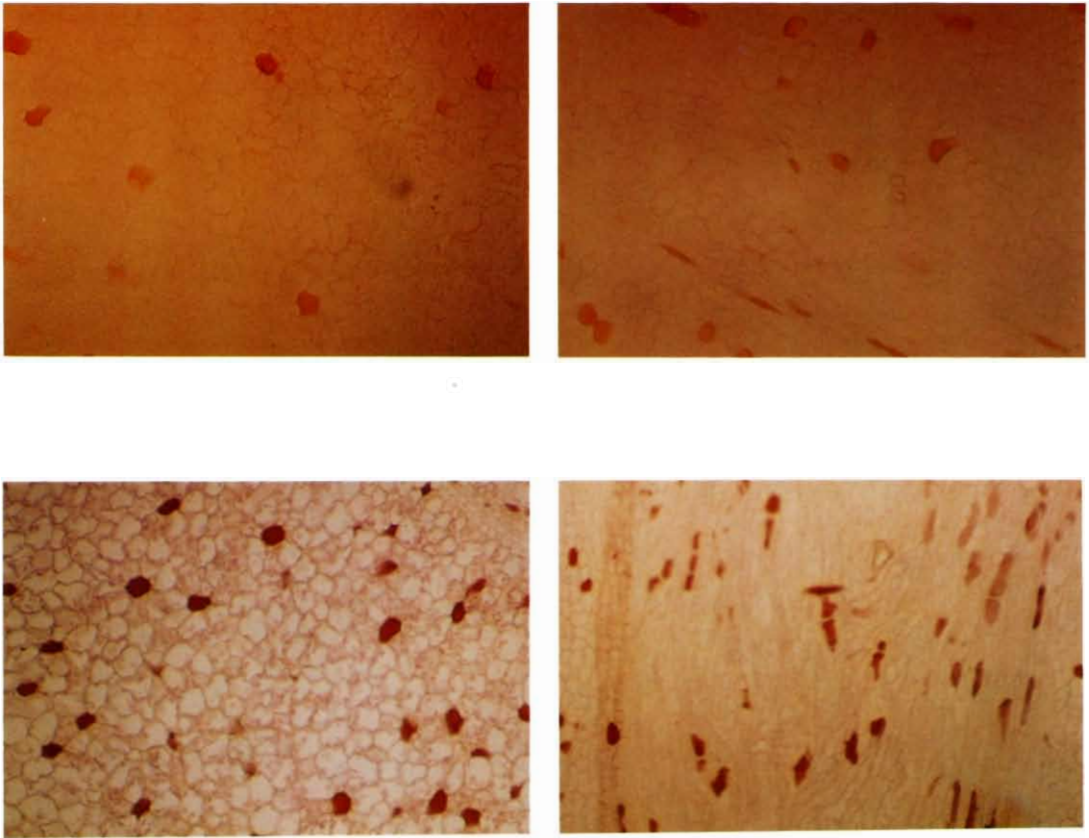


Plate I
Essential oil cells in purple nutsedge tubers.
A, B: cross section
C, D: longitudinal section
A, C: intact section
B, D: section after anise aldehyde reaction