

ダイズ茎疫病を防除する微生物農薬の探索と機能物質の同定

木谷 茂*・仁平卓也

大阪大学生物工学国際交流センター

Isolation of Natural Bioactive Compounds Against Plant Pathogenic Oomycete *Phytophthora Sojae*

Shigeru KITANI* and Takuya NIHIRA

International Center for Biotechnology, Osaka University, OSAKA 565-0871

ABSTRACT

Phytophthora sojae, belonging to oomycetes, is responsible for root- and stem-rot disease in soybean, and causes multibillion dollar losses in worldwide agriculture. Until now, considerable attention has been paid over the last two decades to the biological control of the plant pathogen. Although the use of synthetic chemicals has been effective to prevent the outbreak of the plant disease, it might provide negative effects on non-target organisms or the development of pest resistance, suggesting that there is a need to develop alternative control systems to replace or complement conventional pesticide usages, such as by finding new natural control agents. Here, we performed the screening of the endophytic actinomycetes that show anti-oomycete activity, and the purification and identification of anti-oomycete compounds from the culture broth. Ninety-two percent of the endophytic actinomycetes that had anti-yeast activities inhibited the growth of *Phytophthora sojae* P6497 by a dual culture agar assay, indicating that anti-yeast assay is a useful and rapid method to find biocontrol agents against *P. sojae*. From the crude extract of endophytic *Streptomyces griseus* HN46 showing an inhibitory activity toward *P. sojae*, actinophenol, which is known as an anti-fungal compound, was identified as a major metabolite, based on both the MS analysis and NMR analysis. Unfortunately, the bioassay demonstrated that actinophenol did not inhibit the mycelial growth of *P. sojae*. Our endophytic actinomycetes showing anti-*P. sojae* activity may contribute to the development of biocontrol agents against *P. sojae*. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 45-49, 2015.

*〒565-0871 吹田市山田丘2-1

Key words : plant pathogenic oomycete, *Phytophthora sojae*, streptomyces, *Streptomyces*, biocontrol agent.

卵菌*Phytophthora sojae*を病原とする土壤伝染性病害“ダイズ茎疫病”は、ダイズを枯死させ、日本各地に被害を与える¹⁾。本病害には、耕種的方法や化学農薬の散布により対処しているのが現状であり、その防除効果は完全ではない。これまでの化学農薬の濫用は、薬剤耐性菌を発生させると同時に、植物生長に必要な微生物までも殺し、環境生態系を著しく乱すことが危惧されている。したがって、これらの方法を代替する安全かつ環境に優しい防除技術の開発が必要とされている。

近年、植物の生長を促進する、または病害を防ぐ「生物農薬」が次世代型農薬として注目されている。生物農薬は、化学農薬に比べ害虫や病原菌に抵抗性を生じさせることは少なく、ダイズ生育に有益な微生物を駆逐しないと期待される。今までに、一部の土壌由来微生物が生物農薬として利用されてきたが、植物への定着性が疑問視されてきた。そこで、生物農薬の新たな分離源として、植物に関心が集まっている。植物内に共生する微生物を利用すれば、定着率の問題を克服し、実用的な生物農薬の開発につながると考えられる。

抗菌剤などの生物活性物質は、土壌微生物である放線菌から単離されることが多い²⁾。一方、植物内生放線菌からも、生物活性物質に関する報告が相次いでいる³⁾。この植物内生放線菌の一部は、病害抵抗性を植物に付与することが知られており、植物内生放線菌は、生物農薬の探索源として魅力的なターゲットであるといえる。本研究では、ダイズ茎疫病を防除する生物農薬を探索するため、生物活性物質の主要生産微生物である放線菌から、*P. sojae*生育拮抗菌を特定する、または*P. sojae*生育阻害物質を同定することを目的とした。

方 法

微生物材料

*P. sojae*生育阻害活性を示す放線菌または機能物質の探索源として、静岡県に自生する植物から分離した植物内生放線菌を用いた。抗真菌活性の被検菌として、酵母*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6275と酵母*Candida albicans* OUT 6266を用いた。対峙培養の被検菌として用いた*Phytophthora sojae* P6497は、北海道大学大学院農学研究院の崎浜靖子博士から提供い

ただいた。

抗真菌活性の測定

酵母培養液をYPD固体培地に加え、バイオアッセイ用培地とした。植物内生放線菌をISP2培地またはISP4培地（共にDifco社製）にて30℃、1週間培養し、コルクボーラーにて直径1 cmの放線菌培養寒天片を調製した。この培養寒天片をバイオアッセイ用培地上に静置し、30℃で一晩培養した後、寒天片周辺に観察される生育阻止円の大きさから抗真菌活性の強度を観察した。

*P. sojae*生育阻害活性の測定

*P. sojae*をPDA培地にて25℃、1週間培養し、コルクボーラーにて*P. sojae*培養寒天片を調製した。*P. sojae*培養寒天片と放線菌培養寒天片を4 cm間隔にてPDA培地上に静置し、4日間培養した。放線菌培養寒天片の周辺に観察される*P. sojae*生育阻止範囲から、*P. sojae*生育阻害活性を測定した。また、培養精製物の活性測定では、ペーパーディスク（ADVANTEC社製）を用いた。

放線菌代謝物の解析

植物内生放線菌を2種類の液体培地で培養後、*n*-ブタノールで代謝物を抽出した。*n*-ブタノール抽出物をジメチルスルホキシドに再溶解させ、逆相HPLCにより分析し、各ピークの200～600 nmにおける吸収波長を測定した。*S. griseus* HN46の培養液500 mLを酢酸エチルにて抽出、濃縮乾固した後、アセトニトリルに再溶解させたサンプルを逆相C₁₈クロマトグラフィーに供した。40%アセトニトリル画分に溶出した標的化合物（1）を逆相C₁₈-HPLCにより精製し、10.5 mgの1を回収した。1の分子量をHR-FAB-MS解析により、そのNMRスペクトラムを600 MHz ¹H-NMRと150 MHz ¹³C-NMRにより分析した。

結 果

分離した植物内生放線菌の抗真菌活性解析

本研究の対象として、研究室が保有する静岡県由来植物内生放線菌102株を使用した。植物内生放線菌の*P. sojae*に対する生育阻害活性を対峙培養アッセイ

により評価するには時間を要するため、比較的簡易にできる抗真菌活性を観察することにした。ただし、抗真菌活性と抗*P. sojae*活性の相互関係は知られていない。バイオアッセイの結果、*S. cerevisiae*または*C. albicans*の片方に対し少なくとも生育阻害活性を示す植物内生放線菌は64菌株であり、またその活性強度も異なることが明らかとなった (Fig. 1)。

対峙培養アッセイによる*P. sojae*生育阻害活性の解析

次に、抗真菌活性を示した植物内生放線菌64菌株を用いて、*P. sojae*に対する生育阻害活性を解析した。植物内生放線菌と*P. sojae*の培養寒天片を同時に静置し、*P. sojae*の生育が遅延する、または阻害される現

象を観察した (Fig. 2)。その結果、植物内生放線菌をISP2培地で培養した場合、61菌株にて抗*P. sojae*活性を、またISP4培地で培養した場合、59菌株が活性を示した。抗真菌活性を示した植物内生放線菌の内、92%が抗*P. sojae*活性を示したことから、抗真菌活性の解析は*P. sojae*の生育を阻害する微生物または化合物の探索に有効であることが明らかとなった。

分離放線菌の代謝物解析

上述の生育阻害解析と平行して、植物内生放線菌の培養液に含まれる代謝物をHPLCにより解析した。*n*-ブタノール抽出物を逆相C₁₈-DAD解析により分析した結果、いくつかの植物内生放線菌の培養液から、特

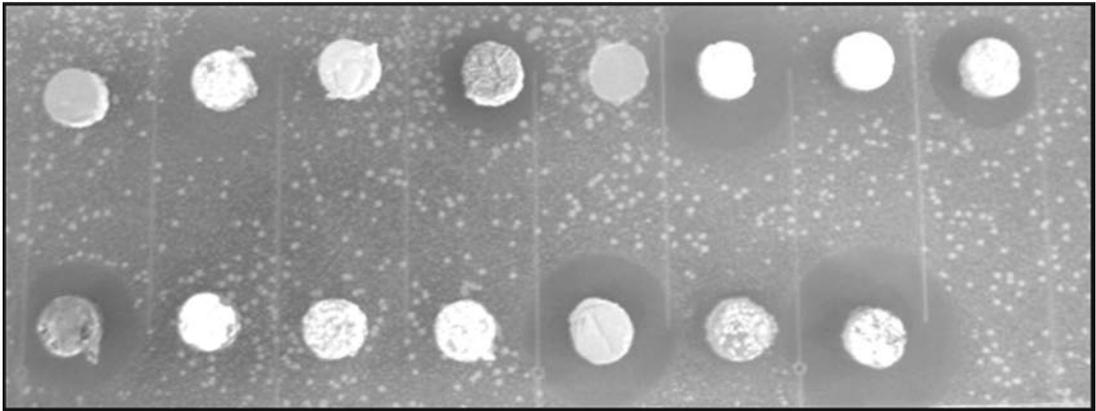


Fig. 1. Bioassay of endophytic actinomycetes by an agar piece method.

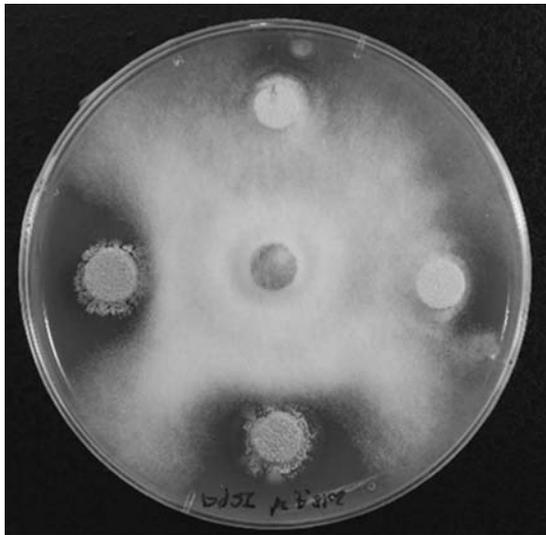


Fig. 2. Dual culture agar assay of endophytic actinomycetes with *Phytophthora sojae*.

徴的なUV/Visスペクトラムを示す代謝物が検出された。得られたUV/Visスペクトラムを研究室の化合物データベースと照合し、新規化合物と推定される代謝物ピークを選定した。

放線菌代謝物の*P. sojae*生育阻害活性

活性解析と代謝物解析を分析し、HN46株とHN70株の2菌株から*P. sojae*生育阻害活性成分を同定することにした。16S rDNA解析により、それぞれを*Streptomyces griseus* HN46と*Streptomyces* sp. HN70と命名した。

牡丹防風 (*Peucedanum japonicum*) から分離した*S. griseus* HN46は、*P. sojae*と*S. cerevisiae*に生育阻害活性を示すが、抗*C. albicans*活性は示さない。培養液を酢酸エチルで抽出し、Sep-Pak C₁₈固相抽出カラムにより酢酸エチル抽出物を精製した。各精製画分をHPLCにより解析した結果、40%アセトニトリル溶出

画分に目的化合物が溶出されていたことより、当画分をさらに精製した。最終的に10.5 mgの精製品1を回収し、質量分析とNMR解析に供した。高分解能FAB-MS解析より、1の組成式を $C_{15}H_{17}NO_4$ と予想し、またNMRスペクトラムの解析から、1はフェノール骨格とグルタイルイミド骨格を含む抗カビ物質アクチフェノール⁴⁾であると結論した。アクチフェノールの抗卵菌活性は報告されていないため、アクチフェノールの*P. sojae*生育阻害活性を検討したが、顕著な抗*P. sojae*活性は検出されなかった (Fig. 3)。

一方、抗真菌活性は示さず、抗*P. sojae*活性のみを示す*Streptomyces* sp. HN70の代謝物解析により、新規化合物と推定されるピークが複数、得られたことから、*S. griseus* HN46と同様にその化合物の精製を進めた。その精製過程で、各化合物の抗*P. sojae*活性を分析したが、アクチフェノールと同様に顕著な活性は検出されなかった。今後、代謝物と抗*P. sojae*活性の関係性について、明らかにする必要がある。

考 察

安全性が高く環境に優しいとされる生物農薬は、次世代型農業を担うと期待される。本研究では、ダイズ栽培に被害を与えるダイズ茎疫病の原因菌*P. sojae*に対して、生育拮抗阻害をもたらす微生物または機能物質の同定を目指した。また、植物に生理影響を与え、かつ環境に低負荷である点を考慮し、多彩な生物活性

物質を生産する植物内生放線菌を、微生物探索源に選択した。植物内生放線菌の活性解析より、抗真菌活性と抗*P. sojae*活性には相関が認められたことより、抗真菌活性の解析は、*P. sojae*生育阻害微生物または化合物の迅速な探索に貢献しうることが明らかとなった。また、研究に使用した植物内生放線菌の60%が抗*P. sojae*活性を示したことは、驚きであった。この集団を代謝物解析のみならず、耐病性テストに供することにより、より実用的な生物農薬を発見できるのではないかと考えている。一方、これらの放線菌は、植物採集地点、分離方法、形態分化などにに基づき、独立した放線菌であると推定しているため、16S rDNA解析により、より詳細な微生物分類を施す必要がある。

抗*P. sojae*活性を示した植物内生放線菌の代謝物を解析し、代謝物の主要成分としてアクチフェノールを同定したが、抗*P. sojae*活性を示さなかった。マイナー成分が抗*P. sojae*活性に関与する可能性を否定できないが、微量な生産量ではその化学構造を同定することは困難である。しかし、固体培養では良好な活性結果が得られていることより、液体培養の条件や、固体培養からの活性成分抽出法を検討すれば、抗*P. sojae*活性を示す機能物質を獲得できるのではないかと考えている。*S. griseus* HN46と*Streptomyces* sp. HN70以外にも候補株が存在しており、抗*P. sojae*活性物質の探索と構造解析を継続することで、ダイズ茎疫病に有効な生物農薬の開発に繋がることを期待している。

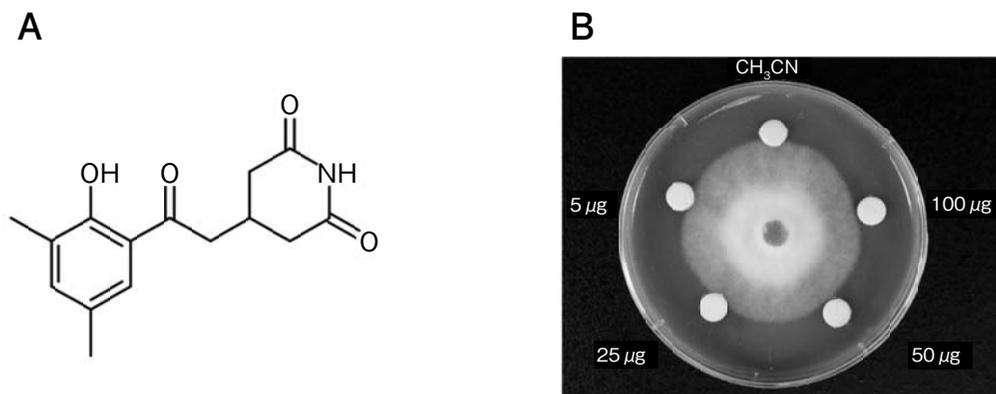


Fig. 3. Bioassay of actiphenol. (A) Chemical structure of actiphenol. (B) Bioassay of actiphenol against *Phytophthora sojae*.

要 約

卵菌*Phytophthora sojae*による土壤伝染性病害“ダイズ茎疫病”は、年間数十億円もの被害を日本各地に与える。本病害には耕種的方法や化学農薬により対処しているが、安全かつ環境に優しい防除技術の開発も求められている。本研究では、ダイズ茎疫病を防除する生物農薬を探索するため、生物活性物質を生産し植物への悪影響が少ないと予想される植物内生放線菌から、*P. sojae*生育拮抗菌を特定し、その生育阻害物質を同定することを目的とした。抗真菌活性を示した植物内生放線菌の内、92%が抗*P. sojae*活性を示したことから、抗真菌活性解析は*P. sojae*生育阻害微生物または抗*P. sojae*機能物質の迅速探索に有効であることが分かった。放線菌*Streptomyces griseus* HN46の主要代謝物質として抗カビ物質アクチフェノールを同定したが、同物質に抗*P. sojae*活性は検出されなかった。今後、抗*P. sojae*活性を示す植物内生放線菌を耐病性テストに供する、または抗*P. sojae*活性物質を同定することで、ダイズ茎疫病に対する生物農薬の開発が可能になると考えている。

文 献

- 1) Kaitany RC, Hart LP and Safir GR (2001): Virulence composition of *Phytophthora sojae* in Michigan. *Plant Dis*, **85**, 1103-1106.
- 2) Bérdy J (2012): Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*, **65**, 385-395.
- 3) Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH and Li WJ (2011): Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, **89**, 457-473.
- 4) Spížek J, Málek I, Suchý J, Vondráček M and Vaněk Z (1965): Metabolites of *Streptomyces noursei*. V. Relation of the production of cycloheximide and actiphenol to the production of fungicidin. *Folia Microbiol (Praha)*, **10**, 263-266.