

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07288

研究課題名(和文) シソ科ハーブ二次代謝産物の抗菌性及び抗酸化能解析並びに植物病害防除利用

研究課題名(英文) Antifungal and antioxidative functions in secondary metabolites of Lamiaceae herbs and plant disease control

研究代表者

松原 陽一 (MATSUBARA, Yoichi)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：40301212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シソ科ハーブ10種におけるin vitro抗菌検定の結果、数種ハーブが相対的に高抗菌性・抗酸化物質高含有ハーブであることが示唆された。一方、耐病性誘導に関するバイオアッセイにより、数種ハーブ抽出液添加による発病軽減効果や病原菌増殖抑制に起因する静菌作用が確認された。これらのことから、ハーブ抽出液に含まれる二次代謝成分(主にフェノール物質群)が単独・複合的にフザリウム菌への抗菌性を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several herb extracts showed high antifungal and antioxidative functions through in vitro test using 10 Lamiaceae herbs. In addition, such herb extracts suppressed Fusarium disease incidence and severity in symptoms through fungistasis effect. These facts suggest that several secondary metabolites (mainly phenols) in Lamiaceae herbs possess antifungal functions for Fusaria.

研究分野：園芸科学

キーワード：ハーブ 抗菌性 抗酸化機能 病害防除 二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

ハーブは精油といった多くの二次代謝産物を含むし、一般に利用される種はシソ科に属するものが多い。ハーブの二次代謝産物には抗菌・抗酸化作用が知られ、臨床・食品微生物を対象に利用研究が行われている。化学農薬使用を削減する植物病害防除法として、ハーブ含有抗菌物質の利用は一つの手段として期待される。しかし、植物病害防除法におけるハーブの抗菌・抗酸化能の効用については国内外で科学的に明らかにされていない点が多い。

一方、植物体では病原菌感染時に活性酸素が発生し、それらを消去する抗酸化物質含量が耐病性に影響することが知られている。このことから、ハーブ含有抗酸化物質の外部投与においても活性酸素消去促進といった、抗菌性とは別の機作で植物体の耐病性向上に寄与できる可能性がある。しかし、ハーブの抗酸化能についての調査事例は非常に少なく、さらに、抗菌性・抗酸化能双方に着目した植物病害防除法についても明らかにされていない。一方、ハーブを病害防除法として利用する場合、精油以外の複数の二次代謝産物も含む植物体抽出液処理法とは別にコンパニオンプランツとしての手法も考えられる。コンパニオンプランツはカバークロープとしての機能も有し、二種以上の植物を混植することにより植物体生長促進、病虫害軽減効果が現れることが経験的に知られているが、化学的・生物的作用機構については不明な点が多い。

申請者はこれまでに、有用微生物であるアーバスキュラー菌根菌 (AMF) による数種園芸植物における病害防除法効果を見出している。AMF は植物根に感染し、主に土壌中のリン吸収を促し宿主生長を促進する共生菌で、1997 年に地力増進法により政令指定され、リン資源の有限性も背景としその利用が推奨されている。しかし、ハーブと

併用した場合の耐病性誘導における相互作用については明らかにしておらず、国内外においても報告がみられない。

2. 研究の目的

本研究では、抗菌・抗酸化作用が期待されるシソ科ハーブ 10 種を対象とし、園芸植物に関連する数種病原菌へのハーブ抽出液の抗菌性評価、二次代謝産物のメタボローム解析・抗菌物質の同定、抗酸化能評価、ハーブ抽出液処理法及びコンパニオンプランツ法による植物病害防除法、ハーブ利用による根圏微生物相変動解析、有用微生物 (AMF) との併用による病害防除法を行う。これらにより、シソ科ハーブの抗菌・抗酸化能を主体とした新規植物病害防除法を確立し、その防除機構を化学的・生物学的側面から科学的に解明する。

3. 研究の方法

(1) シソ科ハーブ抽出液の数種病原菌への *in vitro* における抗菌性評価及び抗酸化機能解析

シソ科ハーブ10種 (オレガノ、キャットニップ、セージ、ダークオパール、タイム、バジル、ヒソップ、ペパーミント、ラムズイヤー、レモンバーム) の蒸留水抽出液を添加 (0.5、2%、w/v) した Czapek-Dox 液体培地にアスパラガス立枯病菌、イチゴ萎黄病菌、シクラメン萎凋病菌、メロンつる割病菌、トマト萎凋病菌の分生孢子懸濁液を混合し増殖指数を算出した。

一方、上記シソ科ハーブ 10 種の地上部及び地下部抽出液におけるフリーラジカルへの抗酸化能について、DPPH ラジカル捕捉能、抗酸化物質 (ポリフェノール、アスコルビン酸) 含量について解析した。

(2) ハーブを用いた耐病性検定

抗菌性ハーブとして選抜したレモンバー

ム、オレガノ、セージ、ヒソップの茎葉部抽出液処理により、アスパラガス立枯病、イチゴ萎黄病及びシクラメン萎凋病に対する耐病性誘導のバイオアッセイを行った。

(3) シソ科ハーブ二次代謝成分のメタボローム解析及び抗菌物質同定

耐病性誘導が確認されたハーブ(オレガノ、セージ、ヒソップ、レモンバーム)の茎葉部抽出液について、二次代謝成分(フェノール、テルペノイド、アルカロイド類等)のメタボローム解析をLC-MS(Q ToF-UPLC-MS/MS)により行った。また、分離同定された相対的多量物質について、in vitroにおける抗菌性の検証を行った。LC-MSでは逆相カラム、アセトニトリル・蟻酸溶媒を主体に用い、抗菌検定はCzapeck doxを基本培地として行った。

(4) シソ科ハーブと菌根菌の相互作用

これまでに選抜された抗菌性・高抗酸化能である4種シソ科ハーブ(レモンバーム、オレガノ、セージ、ヒソップ)について、植物共生菌であるアーバスキュラー菌根菌4菌株(*Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. intraradices*)の接種検定、耐病性誘導評価を行った。

(5) シソ科ハーブのコンパニオンプランツ及び忌地圃場土による生育改善評価

コンパニオンプランツの圃場評価として、アスパラガス忌地圃場土(病原菌汚染土:長野県より採取)及び市販育苗土(アスパラガス立枯病菌を接種)に、レモンバームとアスパラガス(‘Welcome’)のコンパニオンプランツ処理を行い、耐病性及び生育改善評価を行った。

4. 研究成果

(1) シソ科ハーブ抽出液の数種病原菌へ

のin vitroにおける抗菌性評価及び抗酸化機能解析

アスパラガス立枯病菌に対する10種シソ科ハーブ抽出液の抗菌性評価の結果、特にオレガノ0.5%・2%、セージ2%、レモンバーム0.5%・2%区で立枯病菌増殖指数が無添加区より低下し、抗菌性が確認された(図1)。また、シソ科ハーブ10種の抗酸化能評価の結果、DPPHラジカル捕捉能、総ポリフェノール及び総アスコルビン酸含量において、オレガノ、セージ、レモンバームは比較的高い傾向がみられた(図2)。この場合、抗菌性と抗酸化能に相関はみられなかった(図3)。

また、抗菌効果が高かったオレガノ、セージ、ヒソップ、レモンバームの4種において他のフザリウム菌への抗菌検定を行った。その結果、茎葉部・根部抽出液添加区ともに、最大で対照区の2割程度にまで増殖を抑制する効果がみられた(図4)。

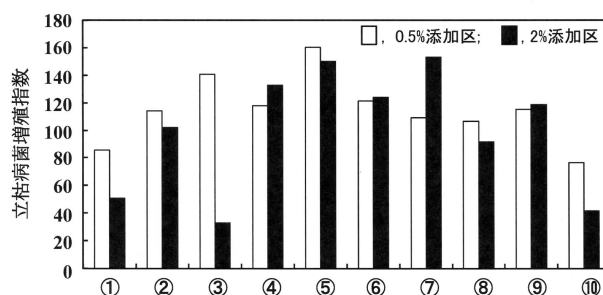


図1 シソ科ハーブ抽出液における立枯病菌増殖指数
①, オレガノ; ②, キャットニップ; ③, セージ;
④, ダークオパール; ⑤, タイム; ⑥, バジル;
⑦, ヒソップ; ⑧, ペパーミント; ⑨, ラムズイヤー;
⑩, レモンバーム

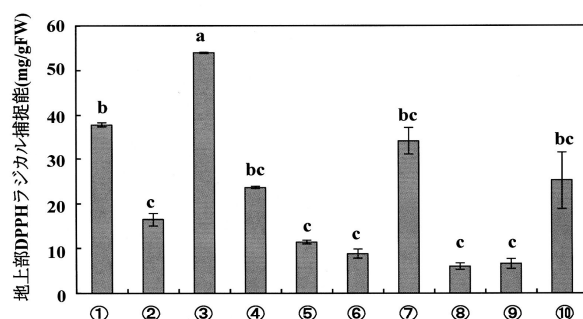


図2 シソ科ハーブ茎葉部のDPPHラジカル捕捉能
①, オレガノ; ②, キャットニップ; ③, セージ;
④, ダークオパール; ⑤, タイム; ⑥, バジル; ⑦, ヒソップ;
⑧, ペパーミント; ⑨, ラムズイヤー; ⑩, レモンバーム
異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

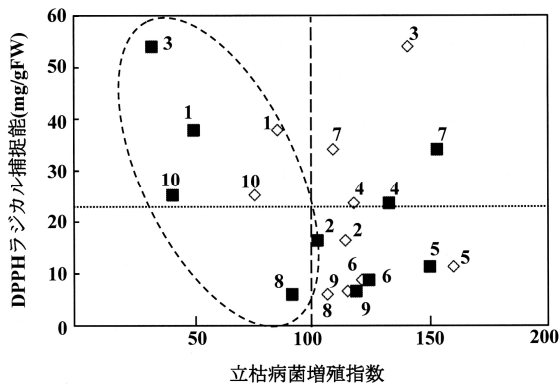


図3 シソ科ハーブ茎葉部におけるDPPHラジカル捕捉能と立枯病菌増殖指数の関係
 1, オレガノ; 2, キャットニップ; 3, セージ; 4, ダークオパール;
 5, タイム; 6, バジル; 7, ヒソップ; 8, ペパーミント;
 9, ラムズイヤー; 10, レモンバーム
 ◇, 0.5%; ■, 2%.

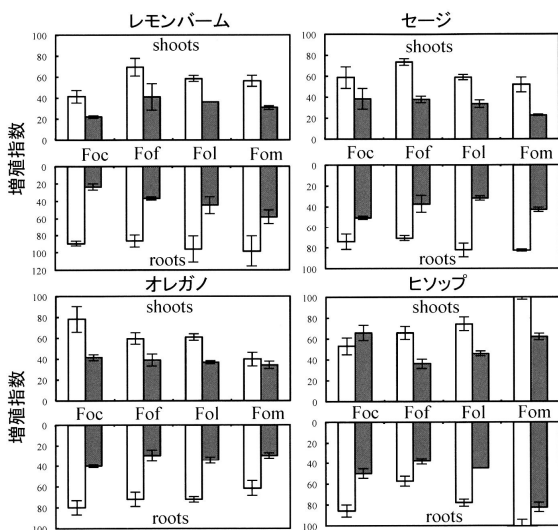


図4 ハーブ抽出液がフザリウム菌増殖に及ぼす影響
 Foc, シクラメン萎凋病菌; Fof, イチゴ萎黄病菌;
 Fol, トマト萎凋病菌; Fom, メロンつる割れ病菌。
 □, 0.5%; ■, 2% (w/v): 抽出液濃度。

(2) ハーブを用いた耐病性検定

アスパラガス立枯病、イチゴ萎黄病及びシクラメン萎凋病において、数種ハーブの茎葉部抽出液処理による発病軽減効果が確認された。この場合、根圏土壌及び根中におけるフザリウム菌菌量もハーブ抽出液処理区で有意に低下していた。これらのことから、シソ科ハーブの茎葉部抽出液処理によりフザリウム病における発病抑制効果が確認され、耐病性誘導には特に病原菌増殖

抑制・病原性低下に起因する静菌作用（殺菌作用を含む）が関連することが示唆された。

(3) シソ科ハーブ二次代謝成分のメタボローム解析及び抗菌物質同定

シソ科ハーブ二次代謝成分のメタボローム解析の結果、共通したRTに数種二次代謝成分のピーク検出が確認され、MS解析により、ハーブ間で共通する成分及び異なる成分特徴が確認された(図5)。MS/MSによるフラグメント解析から、数種フェノール物質が共通して含まれることが示唆され、その数種フェノール物質にはフザリウム菌への増殖抑制効果があることをin vitro検定で確認した。よって、耐病性誘導には数種フェノール物質による静菌作用が関与していることが示唆された。一方、4種ハーブではそれぞれ共通した抗菌成分を含有する可能性はあるが、ハーブ種により抗菌物質群が異なることも示唆された。

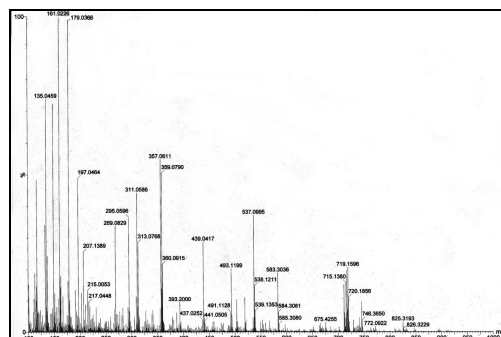
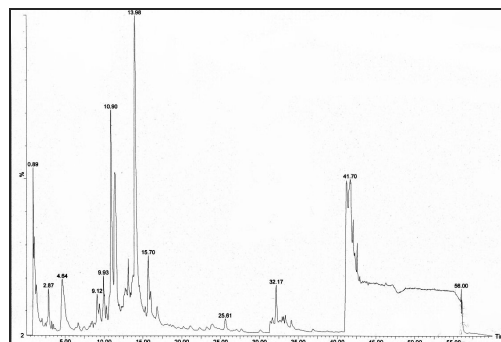


図5 レモンバーム葉抽出液のメタボローム解析。

(4) シソ科ハーブと AMF の相互作用

アーバスキュラー菌根菌 (AMF) 感染は4種全てのハーブにおいて確認され、感染率にはハーブ種・菌種の組合せにより差がみられた。また、共生個体では茎葉伸長促進、葉数増加といった植物体生長促進効果が確認された。また、菌根菌共生によるハーブの抗酸化物質含量 (総ポリフェノール、総アスコルビン酸、DPPHラジカル捕捉能) では共生による大きな変動はみられなかったが、LC/MSによるメタボローム解析では、数種2次代謝成分においてAMF接種区での増大が確認された。続いて、レモンバーム抽出液及びAMFの複合処理がイチゴ炭疽病耐性に及ぼす影響を調査した。その結果、イチゴ (‘とちおとめ’) における炭疽病発病・発病程度の軽減効果が確認され、複合処理区でさらに効果が高まる場合がみられた。

(5) シソ科ハーブのコンパニオンプランツ及び忌地圃場土による生育改善評価

アスパラガス単独区では、フザリウム菌に起因する立枯症状 (根褐変、茎葉黄化) が忌地圃場土・市販育苗土 (立枯病菌接種) の両区で重度に発現した。一方、レモンバームコンパニオン区では、両土壌区で根褐変・茎葉黄化が軽減され、植物体乾物重も単独区より増大する場合があった。これらのことから、実際の忌地圃場でのハーブのコンパニオンプランツ法が、アスパラガスの忌地症状を改善できる可能性が示唆された。

(6) 総合考察

今回供試したシソ科ハーブ 10 種の中では特にオレガノ、セージ、ヒソップ、レモンバームが相対的に高抗菌性・抗酸化物質高含有ハーブであることが示唆された。これらのことから、シソ科ハーブ抽出液には、

数種フザリウム菌増殖を共通的に抑制する作用がある可能性が示唆された。一方、バイオアッセイを行った結果、ハーブ抽出液添加区における発病軽減効果や病原菌増殖抑制に起因する静菌作用が確認された。これらのことから、ハーブ抽出液に含まれる二次代謝成分が単独・複合的にフザリウム菌への抗菌性を示すことが示唆され、ハーブ種間における共通 (主に数種フェノール物質) または異なる抗菌物質群が関連する可能性が考えられる。この場合、病害防除・生育改善に關与する抗菌物質の特定には、*in vitro* 検定及びバイオアッセイを併せた総合的評価が必要と考えられる。一方、前述のシソ科ハーブの抗酸化能評価の結果も含め、抗菌性ととも、ハーブ含有抗酸化物質の外部投与・吸収による酸化ストレス軽減も今回の耐病性誘導に関わっている可能性があると考えられる。また、ハーブ抽出液処理による植物病原菌への静菌作用といった直接的影響の他に、植物体の抵抗性誘導といった間接的因子も耐病性に複合的に関わることも考えられる。

以上のことから、数種シソ科ハーブはフザリウム菌に対する高い抗菌性を有することが示唆され、フザリウム病害防除に有効であることが示唆された。これにより、高抗菌性シソ科ハーブ抽出液の根域処理、混植、カバークロープ、細片の土壌すき込み等、栽培場面に応じた利用法により、直接的・間接的に植物体の耐病性誘導が可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Matsubara, Y., Hiraki, Y., Liu, J. and Shiam, I. H.: Fungistasis effect of *Lamiaceae* herbs on several fusaria causing horticultural plant diseases. *Acta Hort.* (In press) 査読有

Hiraki, Y. and Matsubara, Y.: Effect of secondary metabolites in lemon balm on anthracnose control in strawberry. Acta Hort. (In press) 査読有

松原陽一: シソ科ハーブの園芸植物病害における抗菌作用について. 農耕と園芸 73(4): 20-23, 2018.

Matsubara, Y., Liu, J. and Shiam, I. H.: Antifungal effect of *Lamiaceae* herbs on Fusarium wilt in strawberry. Acta Hort. 1156:715-720, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

清 美樹・武島実里・松原陽一・近藤俊文: シソ科ハーブ2次代謝成分のメタボローム解析並びにハーブ抽出液によるイチゴの耐病性誘導. 園芸学会H30年度春季大会. 園学研(別冊1): 465, 2018(奈良).

Hiraki, Y. and Matsubara, Y.: Effect of secondary metabolites in lemon balm on anthracnose control in strawberry. Greensys. Abstract:171, 2017(China).

Matsubara, Y., Liu, J. and Shiam, I. H.: Effect of *Lamiaceae* herbs on fungistasis to several Fusaria and metabolome analysis. Asian Hort. Congress Abstract:136, 2016(中国)

Matsubara, Y., Liu, J. and Shiam, I. H.: Antifungal effect of *Lamiaceae* Herbs on Fusarium wilt in strawberry. 8th Int. Sym. Strawberry. Abstract:103, 2016(カナダ)
(口頭発表)

森田 亘・松原陽一・鷹見直美: シソ科ハーブ2次代謝成分によるシクラメンの耐病性誘導および静菌作用. 園学研(別冊1): 447, 2016(神奈川).

森田 亘, 松原陽一: シクラメン病害におけるシソ科ハーブ二次代謝成分の抗菌性評価. 園芸学会東海支部

H27年度研究発表会. 講演要旨:6, 2015(静岡).

森田 亘, 松原陽一: 園芸植物病害におけるシソ科ハーブ二次代謝成分の抗菌性評価及びメタボローム解析. 農業技術管理学会 H27 年度大会. 講演要旨:25-26, 2015(鳥取)

森田 亘, 松原陽一: シソ科ハーブの園芸植物病害への抗菌性評価及びメタボローム解析. 第25回植物微生物研究会講演要旨:93-94, 2015(筑波).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~ymatsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松原 陽一 (MATSUBARA, Yoichi)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 40301212