

様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年 6月 22日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2008
課題番号：18580336
研究課題名（和文）糸状菌が生産する揮発性抗菌物質を活用した環境リスク菌類の制御技術の確立
研究課題名（英文）Studies on biocontrol of harmful fungus by a filamentous fungus which produces antifungal volatiles.
研究代表者
小板橋 基夫（KOITABASHI MOTOO）
独立行政法人・農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員
研究者番号：10355662

研究成果の概要：食生活や住環境において、カビ毒生産菌やアレルゲンとして有害糸状菌が環境リスク上問題となり、これら有害菌類の制御技術が求められている。そのため、閉鎖空間等で有効な揮発性の新規抗菌物質を生産する糸状菌の選抜を行い、新規に4菌株の揮発物質生産菌を選抜した。それらのうち、別種と考えられる3菌株から生産される揮発成分を解析したところ、いずれの菌株からもテトラヒドロフランが検出された。これらの結果より、揮発物質を生産して抗菌作用を示す糸状菌が様々な分類群にわたる菌株で複数存在していることが明らかとなった。また、その抗菌作用にはフラン化合物が関与していることが、世界的に見ても初めて明らかになった。既に選抜されていた *Irpex lacteus* (Kyu-W63) の生産するフラン化合物の一種であるペンチルフルフラールはアレルゲンなどの原因菌の生育を抑え、徐放剤に吸着させることにより長期抗菌活性を維持することが可能であり、製品化のための施用法が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：環境リスク菌、揮発物質、静菌作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 食生活や住環境において、カビ毒生産菌やアレルゲンとして有害糸状菌が環境リスク上問題となり、これら有害菌類の制御技術が求められている。そのため、閉鎖空間等で有効な揮発性の新規抗菌物質を生産する糸状菌の選抜を行う。

(2) すでに選抜されている揮発性の新規

抗菌物質を生産する糸状菌 (*Irpex lacteus*) の抗菌特性について解析を行う。

2. 研究の目的

(1) 申請者が開発した農業環境からの揮発性生産微生物の特異的検出法によって分離した新規の抗菌機作を有する微生物を供試し、健康および環境リスクとして問題と

なる *Aspergillus* 属等の菌類に対して防カビ効果の高い菌株を選択する。

(2) 抗菌物質の類縁体などの抗菌効果や効果の高い徐放剤等を検討して製品化への基礎的知見の蓄積を行う。

3. 研究の方法

(1) 申請者らは、様々な有用特性を持つ可能性のある微生物を各種作物の体表から分離・同定して収集し、微生物インベントリーとして維持、管理している。その中に、イネ科作物（オオムギ、コムギおよびイネ）の葉面から、3年間にわたって収集した糸状菌の菌株が2000以上あり、その中から新規抗菌物質を生産する糸状菌の選抜を行った。

PDA培地を流し込んだ9cmペトリ皿に、供試菌の菌叢を4日間培養し、別のPDA平板の中心にトマト萎凋病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (MAFF744006)の直径5mmの菌そうを移植したペトリ皿に被せて培養を行い、拮抗能を持つ菌株の選抜を行った。

(2) 拮抗能が認められた菌株については、GC-MSによるヘッドスペースの解析を行い、得られたピークの成分の同定を行った。揮発物質は非常に微量であるため、検出のためにコールドトラップ機能で濃縮後にカラムに導入した。

(3) 揮発性の抗菌物質を生産する糸状菌 *Irpex lacteus* (菌株名 Kyu-W63) は担子菌、子のう菌、接合菌および不完全菌類等に抗菌活性を持ち、その抗菌スペクトラムは広く、多くの糸状菌の菌糸生育を阻害したが、その他の抗菌メカニズムは不明であった。そこで、本菌の生産する抗菌物質の生理活性部位を特定するため全ゲノム配列が解明されている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた解析を行った。

(4) PDA培地を流し込んだ9cmペトリ皿に、Kyu-W63の菌叢を4日間培養し、別のPDA平板の中心にバイオセーフティーレベル2の *Penicillium islandicum* (NBRC 5234)、*Aspergillus fumigatus* (NBRC 31952)、*A. restrictus* (NBRC 31385) および畳などの変色原因菌である *Wallemia sebi* (NBRC 32277) を置床したものにかぶせて密封し、25℃の恒温器に置いて経時的に菌叢の直径を測定した。また、室内汚染菌についても、生育抑制を調査した。

(5) Kyu-W63により、閉鎖空間である室内環境の有害菌類の抑制効果が認められるかを Hocking and Pitt (1980) の開発したジクロラングリスエロール寒天 (DG-18) 培地とミニチュアハウスを用いて検討した。

(6) Kyu-W63の生産するペンチルフルフラールの製品化のために必要な徐放剤につ

いて、高分子ポリマー素材の検討を行う。また、ペンチルフルフラールの類縁体の抗菌作用の確認を行う。

4. 研究の成果

(1) 2017株の葉面微生物から揮発成分で拮抗作用を持つ微生物をスクリーニングした結果、数種の拮抗菌が選抜されたが、その内の菌株 25-2-1 は MAFF744006 の生育と培地上における色素生産を抑制した(図1)。本菌は白色の菌糸体のみ形成し、形態的同定が困難であったため、プライマー ITS 1および ITS 4を用いてrDNAのITS 1+5.8s rDNA + ITS2領域をPCR法で増幅し、Dye Terminator法でダイレクトシーケンシングを行い、BLAST検索を行った。その結果、菌株 25-2-1 はサルノコシカケ科カワラタケ類の *Trametes* sp.と98%の相同性を示した。

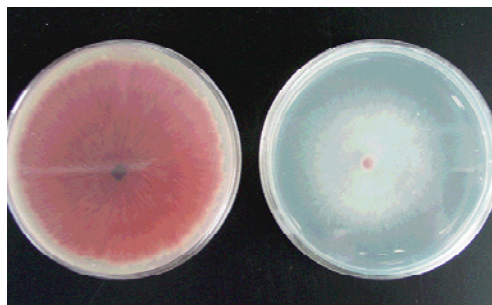


図1. 菌株 25-2-1 によるトマト萎凋病菌の生育抑制 (左: 対照、右: 菌処理)

さらに選抜された菌株について同様の解析を行い同様な解析を行ったところ、2菌株(菌株名 B12-2-1 および B1-2-1)は *Nectria* 属菌と類縁性が高かった。残りの1菌株(菌株名 WH1-2-1)は *Peniophora incarnata* と類縁性が高かった。

(2) 3菌株(B12-2-1、B1-2-1、WH1-2-1)についてGC-MSによるヘッドスペースの解析を行ったところ、いずれもテトラヒドロフランのピークが検出された。これらの結果より、揮発物質を生産して抗菌作用を示す糸状菌が様々な分類群にわたる菌株で複数存在していることが明らかとなった。また、その抗菌作用にはフラン化合物が大きく関与することが、世界的に見ても初めて明らかになった(図2, 3, 4)。なお、菌株 25-2-1 については培養中に変異が生じ、抗菌活性の低下が認められ、GC-MSの解析にもピークが観測されず、物質の生産能が消失した。

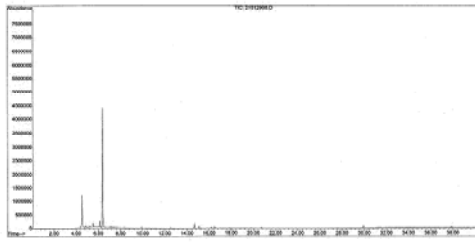


図 2. B12-2-1 の解析結果

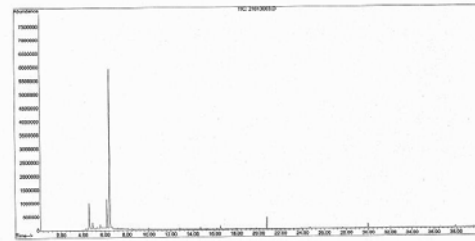


図 3. B1-2-1 の解析結果

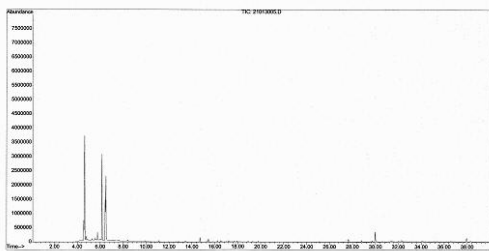


図 4. WH1-2-1 の解析結果

(3) Kyu-W63は担子菌、子のう菌、接合菌および不完全菌類等に抗菌活性を持っており、子のう菌類に含まれるキュウリうどんこ病菌の胞子の発芽管の伸長を強く抑制した(図5)。

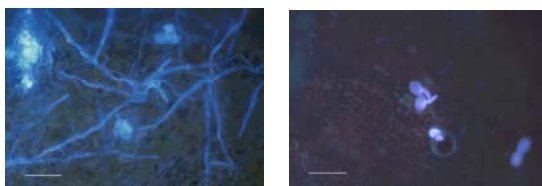


図 5. キュウリうどんこ病菌のキュウリ葉面における生育抑制 (接種 48 時間後)
左: 無処理 右: Kyu-W63 処理 紫外線下観察 (bar: 80 μ m)

Kyu-W63は、分類的に子のう菌に所属する出芽酵母の*S. cerevisiae*の野生株の生育は

抑制しなかった。その理由として、図 5 で観察されたとおりKyu-W63は糸状菌の菌糸生育を強く阻害するのにに対し、*S. cerevisiae*は出芽で増殖し、菌糸を形成しないためと推測された。本菌の抗菌作用の詳細な生理活性を明らかにするため、*S. cerevisiae*の全ゲノムの5/6を占める非必須遺伝子を1個ずつ破壊した4899菌株を用いて生育試験を行った。*S. cerevisiae*の変異菌の中には、本菌に対して感受性を示す株が349株あった。抑制株の遺伝子解析の結果、本菌の抗菌作用にはタンパク質合成やビタミンB2合成および鉄輸送が関与していることが示唆された。

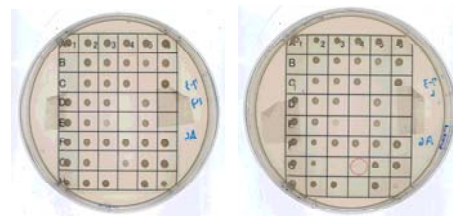


図 6. 組換え *Saccharomyces cerevisiae* を利用した生理活性の解析

左: 無処理、右: Kyu-W63 処理

(丸中の菌株は生育抑制)

(4) 処理開始から Kyu-W63 は4種類の環境リスク菌の培地上における生育を強く抑制し、その効果は 10 日以上継続した (Koitabashi and Tsushima 2007)。ここでは、*A. fumigatus* の抑制効果についての写真 (図7) を示した。Kyu-W63 のペトリ皿を除去した結果、生育の抑制されていたいずれの菌株においても菌糸の伸長が始まったことから、本菌の持つ抑制作用は殺菌的ではなく静菌的であることが推察された。

Kyu-W63 はさらに、室内汚染菌の *Cladosporium cladosporioides* や *Alternaria alternata* などの生育も強く阻害した。



図 7. Kyu-W63 処理による *Aspergillus fumigatus* (NBRC 31952)の生育抑制

左：無処理 右：菌処理（処理 10 日後）

(5) 市販のドールハウスの内部にフェルト性マット、カーテン、ミニチュアベットなどを置き、DG - 18 培地を 20ml 散布し、Kyu-W63を培養した9cmペトリ皿を 2 枚設置した菌処理と無処理で内部に発生する糸状菌の発生について調査した。ドールハウスの前面はアクリル板で密閉した。その結果、Kyu-W63 を処理した物ではほとんど糸状菌の発生が認められなかったが、無処理ではフェルト性マットやカーテンに黒色のカビが繁殖した(図 8)。この結果から、Kyu-W63 による室内有害菌の抑制効果についても期待が持てることが示された。



図 8. ドールハウスを用いた防かび効果

の確認 右：Kyu-W63 処理

左：無処理（処理 14 日後）

(6) Kyu-W63の生産するペンチルフルフラールを高分子ポリマー素材であるサンフレッシュ ST - 5 0 0 D (サンダイヤポリマー社製)に吸着させ、ペトリ皿内で抗菌活性を確認したが、1 g のサンフレッシュに 0.5ml の処理で2週間以上の抗菌活性が維持された。徐放剤とは、家庭用芳香剤などに

利用されている成分を徐々に放出するように工夫された剤の施用法であるが、本菌の生産するペンチルフルフラールをサンフレッシュに吸着させることで徐放剤として利用できることが確認された。ペンチルフルフラールの類縁体のフルフラールについて抗菌活性を確認したところ、4種類の環境リスク菌に対して全く生育が認められない、強い抗菌活性があり、類縁物の応用による低コストでの実用化の可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Koitabashi, M. and S. Tsushima (2007)

Studies on biocontrol of air-borne disease by a filamentous fungus which produces antifungal volatiles. Japan Agricultural Research Quarterly, 41: 4, (261-265). 審査 あり

② 小板橋基夫. ホームユースを目指した新生物防除戦略. 生物農薬の新戦略とバイオコントロール研究の最前線. 日本植物病理学会バイオコントロール研究会編. 第 10 号 (56-63). 日本植物病理学会. (2007). 審査 なし

③ 對馬誠也・小板橋基夫. 微生物インベントリー. 植物防疫. (社)日本植物防疫協会, 63. (168-172) (2009). 審査 なし

[学会発表] (計 2 件)

① 小板橋基夫, 北本宏子, 對馬誠也. 揮発性抗菌物質生産糸状菌 *Irpex lacteus* の抗菌作用機作の解析, 平成21年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集, 94 (2009)

② 小板橋基夫. マイクロフォーエス (*microForce*) の構築とその利用. テクノロジー・ショーケースインソクバ2008 プログラム&アブストラクト. つくばサイエンスアカデミー. (31). (2008)

[図書] (計 1 件)

① 小板橋基夫. ポストハーベストの生物防除. 微生物と植物の相互作用. 百町満朗・對馬誠也 編集 (336-340) ソフトサイエンス社 (2009)

[その他]

アウトリーチ活動

アグリビジネス創出フェア 出典

2008年10月29～30日

<http://agribiz-fair.jp/2008/index.html>

2007年11月27～28日

<http://www.s.affrc.go.jp/docs/agribiz/index.html>

2006年10月25～26日

<http://www.s.affrc.go.jp/docs/agribiz/2006/index.html>

農林水産省主催（東京国際フォーラム）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小板橋 基夫 (KOITABASHI MOTOO)

農業環境技術研究所・生物生態機能研究
領域・主任研究員

研究者番号：10355662

(2) 研究分担者

對馬 誠也 (TSUSHIMA SEIYA)

農業環境技術研究所・生物生態機能研究
領域・領域長

研究者番号：50354080