

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15531

研究課題名(和文)食虫植物に内生する真菌を用いた農薬リード化合物の探索

研究課題名(英文) Search for pesticide lead compounds using endophytic fungi on carnivorous plants.

研究代表者

酒井 一成 (sakai, kazunari)

北里大学・大村智記念研究所・助手

研究者番号：90760075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物を探索源として植物病原菌に対して抗菌物質を生産している微生物を探索し、抗菌物質を取得することを目的とした。環境毒性試験をスクリーニングの一環として導入することで環境に優しい化合物を探索できると考えた。以前採取したモウセンゴケから糸状菌を分離した。真菌類46株を分離し、3株は新種の可能性がある。その後、分離した糸状菌および北里大が保有する微生物ライブラリーを稲いもち病菌に対して抗菌活性評価を行った。環境毒性試験として緑藻類に対しての環境毒性試験を構築し、抗菌活性を示したサンプルに対して評価を行った。その結果、5サンプルを選択し、精製した結果ヒメグルシン、アンチマイシン類をそれぞれ単離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により見出されたvalinomycin、mocimycin及びhymeglusinは今までに農薬用抗菌剤として上市されてこなかった作用機序が予想されていることからこれら化合物の誘導体またはこれらの作用点を決め、その作用点に対して特異的に作用する異なる化合物の提示にも繋がるのが予想される。

研究成果の概要(英文)：The applicant's goal was to use microorganisms as a search source to find microorganisms that produce antimicrobial substances against plant pathogens and to obtain antimicrobial substances. I believed that by introducing eco-toxicity testing as part of the screening process, he would be able to search for environmentally friendly pesticide seed compounds. In the first year, fungi were isolated from previously collected mousseline moss. Forty-six fungal strains were isolated, three of which may be new species. Subsequently, the isolated fungi and the microbial library owned by Kitasato University were evaluated for antimicrobial activity against *P. oryzae*. An environmental toxicity test against *D. subspicatus* was constructed and evaluated against the samples that showed antimicrobial activity. As a result, five samples were selected and purified to isolate hymeglusin and antimycin, respectively.

研究分野：天然物化学

キーワード：P. oryzae D. subspicatus 微生物由来農薬 食虫植物由来微生物

### 1. 研究開始当初の背景

2009年EUは"植物防除製品の上市、並びに理事会司令79/117/ECCおよび91/414/ECCの廃止に関する2009年10月21日の欧州議会および理事会規則(EC)No 1107/2009"導入により既存の農薬の74%は未認可となった。これは「代替があるものは環境や人に対して最もリスクの低い化合物のみ残し他は規制する」という考えに基づいたためである。イタリアにおいて実際に用いられている原体200化合物を調査したところアゾール系殺菌剤を含む82化合物が未認可対象となり小麦などの輸出に大きな影響を与えることが指摘されている(植物防疫68, 117, 2014)。そこで新たな作用機序を有する環境、人に優しい新規農薬(殺菌剤・殺虫剤)の開発が望まれている。申請者が所属する北里大・大村創薬グループでは微生物に特化した創薬研究を推進することでエバーメクチンをはじめ多くの医薬品、農薬を上市してきた。真菌は10万種を超える大分類群であり、今までに15,000化合物を超える二次代謝産物の報告(J. Antibiot., 65, 385, (2012))がある。そのため、真菌二次代謝産物は今後の医薬品、農薬開発に必要な微生物資源である。そこで申請者は新規農薬の探索源として真菌の中でも植物、特に食虫植物から分離される植物関連真菌に着目をした。食虫植物は虫を捕縛、消化するための捕虫葉を持っており、他の植物とは異なる生態的特徴を有している。食虫植物の一種であるウツボカズラからは捕虫葉内液体(消化液)に共生している細菌が消化酵素を分泌し、昆虫を消化の手助けをしている(J. Biosci. Bioeng. 112, 315, (2011))。しかし植物病原真菌や冬虫夏草のように昆虫や植物と密接に関連している真菌類と食虫植物とが関連している報告は未だにない。以上の背景において本研究課題の核心をなす学術的「問い」は

・植物共生真菌は、植物病原菌や昆虫などの外敵からどのように植物(宿主)を守っているのか?

### 2. 研究の目的

申請者は

- 1): 食虫植物から捕虫葉、茎、根ごとに真菌類を分離、種同定を行う。
- 2): 分離した培養抽出液を作成し、植物病原真菌6種および対照群6種に対する抗菌試験の実施、並びに *Artemia salina* に対する殺虫効果試験を行う。
- 3): 植物病原真菌に対して抗菌作用を示すまたは殺虫活性を示す培養抽出物からそれぞれに対して活性を示す化合物の取得を行う。
- 4): 取得した活性物質の構造を明らかにし、新規農薬リード化合物を見つける。ことを目的に研究計画を立案した。

### 3. 研究の方法

- 1) 確率してある植物病原菌に対して食虫植物であるサラセニアから分離してある真菌40種の培養抽出物をペーパーディスク法で抗菌スクリーニングを行う。抗菌活性の選択性を確認するために植物病原菌でないグラム陰性、陽性細菌、真菌に抗菌活性を示さない微生物培養液を選択する。
- 2) 抗菌試験を通過したサンプルは農薬の環境生態に対する影響評価にも採用されている藻類に対する毒性試験を行う。毒性を示さないサンプルを通過とした(図1)。
- 3) 通過した真菌培養抽出物を大量培養し、植物病原真菌活性を指標に各種カラム、分取HPLCを駆使し活性物質を単離する。NMR、LC/MS、IR、UVなどを使用し植物病原真菌活性を有する構造決定を行う。スクリーニングに使用する倒立顕微鏡、培地成分、活性物質の単離に使用する生産培地、有機溶媒、HPLC分析カラムを本研究費で購入する。

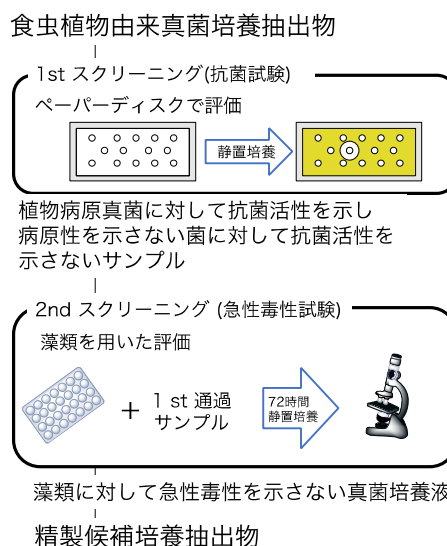


図1 スクリーニングの概要

4) 八丈島および群馬県に自生しているモウセンゴケを採取し、真菌類の分離を行う。分離方法は1) 表面殺菌したモウセンゴケ、2) 捕虫葉および 3) 茎分けたすりつぶし液を作成し平板希釈法で分離を行う(図 3)。形態的特徴および DNA 情報から種レベルでの分類を行い、モウセンゴケの部位での菌叢比較を行う。また採取地点での比較(群馬県と八丈島)も行うことで採取地点での違いを明らかにする。モウセンゴケから真菌の分離を行うにあたって必要なサンプリング渡航費および分離培地、種レベルでの分類を行うにあたって必要なプライマーなどを本研究費で購入する。

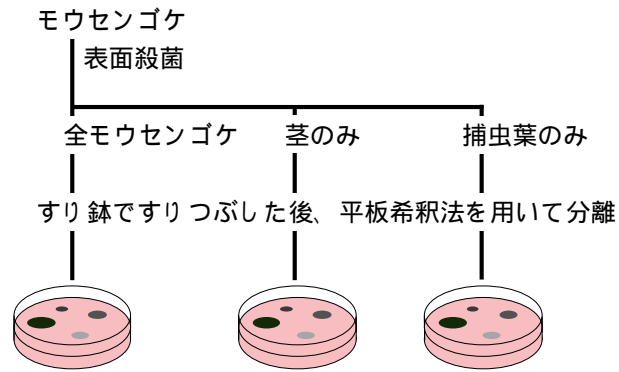


図 2 モウセンゴケからの真菌の分離方法

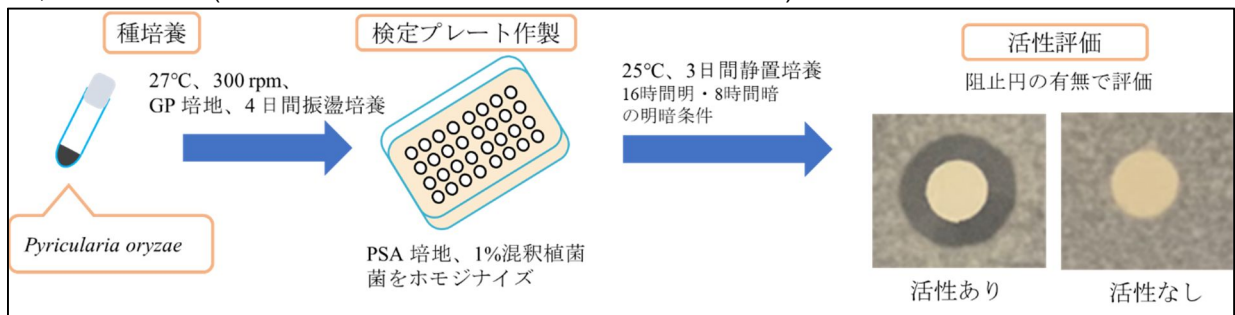
5) 分離、分類を行った真菌類を当研究室で独自に開発した 4 種類の生産培地を使用し培養抽出物を作成する。およびの方法で抗菌、殺虫試験を行い、通過した抽出物からそれぞれの活性物質を取得、構造決定を行う。

#### 4. 研究成果

当初の予定では八丈島に自生しているモウセンゴケを採取し、真菌の分離を行う予定であったが新型コロナウイルスの蔓延により自由にサンプリングに行くことが困難になってしまったため以前採取した本土由来モウセンゴケからの分離及び北里大学が保有している真菌、放線菌培養抽出物を用いてスクリーニングを行った。また当初予定していた植物病原菌だが孢子産生量が多くないためスクリーニングには孢子産生量が多い *Pyricularia oryzae*(稲いもち病菌)を使用することとした。

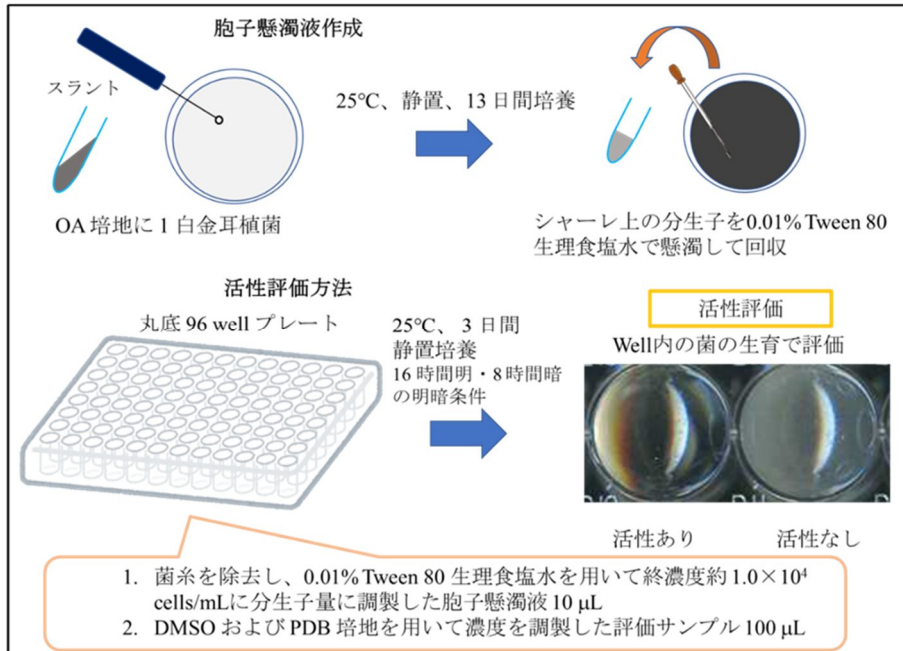
以前採取していたモウセンゴケから真菌類を 46 株分離することができた。全ての株で DNA 解析した結果、3 株が相同性 95%以下であることが明らかとなった。真菌ではバーコーディング領域である ITS 領域において既知種との相同性が 95%以下であれば新種の可能性が示唆される。そのため本研究で得られた 3 株に関しては新種である可能性がある。また本研究で取得した 46 株の真菌を 4 種の二次代謝産物生産培地を培養し、微生物培養物を得た。

下記に示す 2 つの抗菌活性評価 (Scheme 1, 2) を行い北里大学が有している微生物培養液 10,240 サンプル(上記で分離したモウセンゴケ由来糸状菌も含む)を評価した結果、糸状菌培養



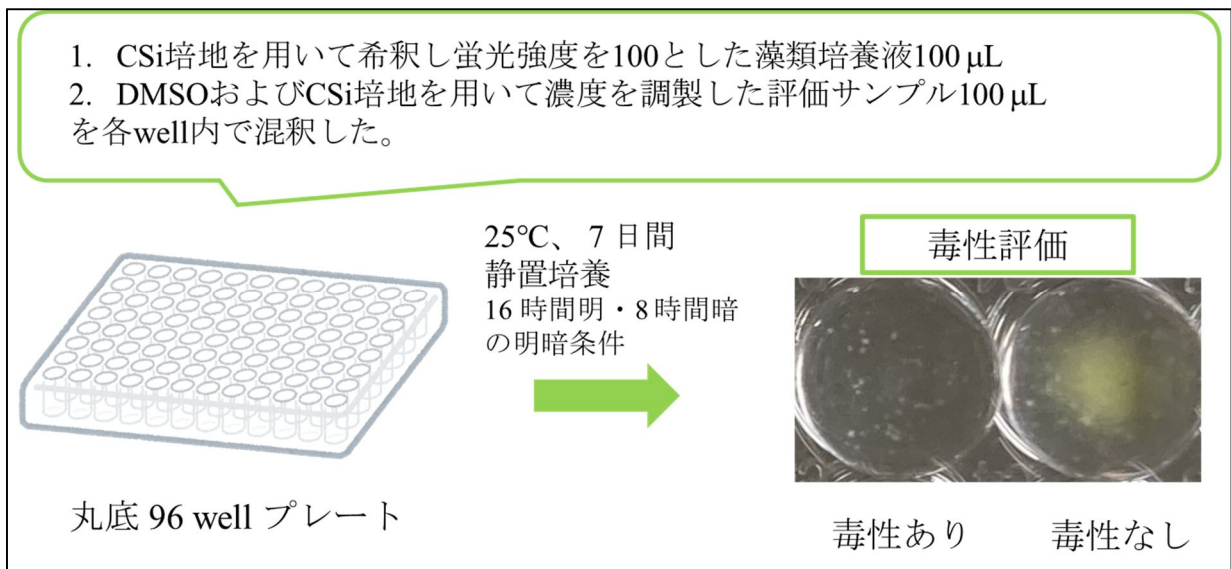
液 15 サンプル、放線菌培養液 7 サンプルを得た。

Scheme 1 Paper disc 拡散法による *P. oryzae* 抗菌活性評価方法



Scheme 2 微液体法による *P. oryzae* 抗菌活性評価方法

選択した 22 サンプルに対して環境毒性試験として下記に示した緑藻類に対する毒性試験 (Scheme 3)を行った。



Scheme 3 *Desmodesmus subspicatus* を用いた環境毒性試験

環境毒性試験の結果 5 サンプル (糸状菌 2 サンプル、放線菌 3 サンプル)が 2  $\mu$ g/mL でも *D. subspicatus* に対して毒性を示さなかったため精製候補株とした。選択した 5 サンプルのうち抗菌活性の強かった K20-0116 株、K21-0029 株培養物から *P. oryzae* に対する抗真菌活性物質の精製を行った。

・K20-0116 株培養液から精製した抗真菌化合物

北里大で使用されている 65 培地を使い生産培養を行った。生産培養物に抗真菌活性を確認したため精製を開始した。定法に従い培養を行い 65 培地培養物 12 L を HP20 カラムに供し、溶出した 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  画分を HPLC にて精製を行った結果、antimycin A 類 8 化合物を得た。Antimycin 類はミトコンドリア電子伝達系 complex を阻害することがわかっており本評価系で取得できる妥当性のある化合物であることがわかった。また K21-0029 株培養液の LC/MS 分析結果から本培養液にも K20-0116 株同様 antimycin A 類の UV スペクトル並びに MS が存在していたため antimycin 類であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|