

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292097

研究課題名(和文) ナラ枯れにおける防御物質と毒素による樹木と病原菌の相互作用の解明

研究課題名(英文) Chemical interaction between oak tree and fungal pathogen in Japanese oak wilt

研究代表者

市原 優 (ICHIHARA, Yu)

国立研究開発法人 森林総合研究所・関西支所・グループ長

研究者番号：10353583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)： ナラ類を大量に枯死させる「ナラ枯れ」におけるブナ科樹木と病原菌の化学物質を介した関係を明らかにすることを目的に実施した。ブナ科樹木の生体防御物質をコナラから5種類を単離し、病原菌に対する防御に關与することを明らかにした。抵抗性の高い常緑カシからも別の防御物質1種類を単離し同定することができた。また、病原菌が生成する毒素活性物質を再確認し、菌株による生成量の差異があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： This study was carried out to clarify the chemical interactions between oak trees and fungal pathogen, *Raffaelea quercivora* in Japanese oak wilt. Five antifungal substances were isolated from *Quercus serrata* and they were associated with chemical defense against the fungal pathogen. One antifungal substance was also isolated from a resistant oak species. A toxin was isolated from *R. quercivora* and the amount of the toxin were different among the fungal isolates.

研究分野：森林病理学

キーワード：菌類 植物

## 1. 研究開始当初の背景

ナラ類を大量に枯死させる「ナラ枯れ」は、九州から青森県まで発生している森林樹木の重要病害の1つである。ナラ枯れの病原菌は「ナラ菌」(*Raffaelea quercivora*)であり、媒介昆虫カシノナガクイムシが宿主樹木の幹に入り込んだ孔道から周囲の辺材にナラ菌が広がり、通水障害と変色を拡大させることによって萎凋枯死が発生する。一方、ナラ菌の侵入後生残した個体では、辺材変色部の拡大停止が認められ、また心材には侵入しないことから、ナラ菌の材内伸展を抑制する抗菌活性物質の存在が示唆される。これまで、ミズナラ辺材の抗菌物質の報告があるが (Ichihara et al. 2010)、他のナラ類については十分に調査されていない。

ナラ枯れは落葉性のコナラやミズナラに被害を発生させるだけでなく、常緑のシイ、カシ類にも被害を及ぼしている。これらのブナ科樹木には病原菌の侵入によっても枯死しない樹種があり、ナラ枯れに対する抵抗性の程度に樹種間で差異がある。また、ナラ菌には同一種内の菌株によって変色を引き起こす病原力に差異が認められている (Kusumoto et al. 2012)。しかし、このような抵抗性や病原力に關与する要因については明らかになっていない。一般に樹木病害における抵抗性と病原力の差異には、化学物質が關与していることが多く、ナラ枯れにおいても化学物質が關与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

このような抵抗性と病原力の差異を背景として、本研究では、抵抗性に關与する防御物質と、病原力に關与する毒素の化学物質に着目して、化学物質のもつ病害抵抗性因子と病原力決定因子としての役割を評価し、樹木と病原菌の相互作用系を解明することを目標として実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 感受性のコナラとミズナラの防御物質

ナラ菌に対するミズナラのもつ抗菌物質として、2,6-ジメトキシベンゾキノンが同定されているが (Ichihara et al. 2010)、コナラなど他樹種については解明されていない。本研究ではコナラ心材の抗菌物質を探索した。コナラ心材のメタノール抽出液を減圧濃縮後分液した酢酸エチル層をシリカゲルカラム等により分画し、抗菌活性を示した物質を精製し同定した。これら抗菌物質について、ナラ菌を接種したコナラとミズナラの辺材における濃度変化を測定し、ナラ菌の進展抑制に対する寄与を検討した。

### (2) 抵抗性樹種における防御物質

ブナ科樹木種間では抵抗性に差がありカシ類、シイ類、コナラ、ミズナラの順で生残率が高いことが知られている。本研究では、

アカガシ、マテバシイ、ミズナラの3樹種を対象に、総フェノールを測定し、化学物質が抵抗性の高い樹種でも關与しているかを調べた。苗畑にて7-9年生アカガシ、マテバシイ、ミズナラにナラ菌を接種後、10、20、30日目に伐採し、辺材を変色部と健全部に分けメタノールで抽出した。各樹種の抽出液はFolin-Ciocalteu methodによる総フェノール濃度の測定に供した。

さらに、アカガシとマテバシイの抗菌物質を探索した。アカガシとマテバシイにナラ菌を接種し30日後に伐採し、接種区と未接種区(対照区)における変色部と非変色部を切り分けそれぞれメタノールで抽出した。抽出物を濃縮した後、酢酸エチル層と水層に分液し、得られた酢酸エチル層を抗菌活性試験(*Cladosporium herbarum*を用いたTLCバイオオートグラフィー)に供し、抗菌物質の存在を確認した。一部の抗菌物質について、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、同定した。

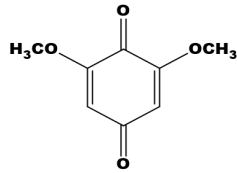
### (3) ナラ菌の毒素の確認と生成量

ナラ菌の植物組織に壊死を引き起こす毒素が培地中に認められることが明らかになっている (杉山ら 2002)。本研究では、この毒素を再確認し、さらに菌株間の生成量と病原力の対応関係を検討した。ナラ菌を米ぬかフスマ培地で培養し、アセトン抽出した抽出液を用いて、分液とシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより毒素活性を示す物質を精製した。ナラ菌の菌株のうち病斑形成能力の異なる菌株間で、毒素生成量を液体クロマトグラフィーで測定した。また、各菌株の抗菌物質耐性を測定した。これらの要因と成長速度を用いて、菌株の病原力に与える影響を解析した。

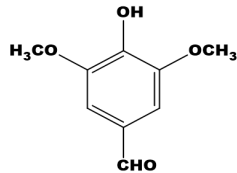
## 4. 研究成果

### (1) 感受性のコナラとミズナラの防御物質

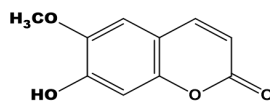
コナラ心材抽出物には複数の抗菌スポットが認められた。このスポットに対応する物質を精製し、感受性のコナラから既知の抗菌物質 2,6-ジメトキシベンゾキノンに加え、4種の抗菌物質、シリングアルデヒド、スコポレチン、パニリン、および3,4,5-トリメトキシフェノールを単離し同定した (図1)。これらの物質を添加した寒天培地ではナラ菌に対する抗菌活性が認められた。とくに、2,6-ジメトキシベンゾキノンの抗菌活性が最も高く、次いでシリングアルデヒド、スコポレチンの抗菌活性が高かった。また、感受性のコナラとミズナラにおける濃度変動を測定した結果、いずれの物質も、ナラ菌接種により変色辺材で濃度が高まり、さらにその周囲の健全辺材でも低濃度ながら濃度が高まった。このことは、ナラ菌が接種点から辺材に侵入して拡大するのを抑制する防御物質として、これらの抗菌物質が機能していることを示している。



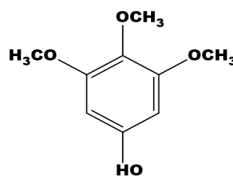
2,6-ジメトキシベンゾキノン



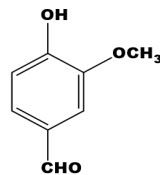
シリングアルデヒド



スコポレチン



3,4,5-トリメトキシフェノール



バニリン

図1 コナラから抽出された抗菌物質

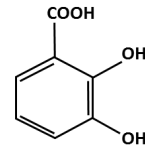
### (2) 抵抗性樹種における防御物質

ナラ菌接種後 30 日目の変色部と健全部における総フェノール濃度はアカガシが最も高く、次いでマテバシイ、ミズナラであった。このことから、抵抗性の高い樹種においてフェノール類のような抗菌物質が関与する可能性が示唆された。

TLC バイオオートグラフィーによる抗菌活性試験の結果、アカガシとマテバシイの酢酸エチル層には変色部において非変色部と比べて強い抗菌活性が確認され、両樹種とも供試量が増加するにつれて高活性を示した。本活性にはアカガシとマテバシイの間で顕著な差は見られなかったが、マテバシイの方がより明瞭な抗菌スポットを示した。このことは、両樹種に抗菌物質が存在することを示している。

これらの抗菌スポットの抗菌物質を分離

精製した結果、ナラ菌に対する主な抗菌物質として、マテバシイからはトリテルペノイド類が単離され、アカガシからはカテキンが単離された。このことは、樹種によりナラ菌感染に対する防御物質が異なる可能性を示唆しており、樹種間の抵抗性の差異を同じ物質を尺度として比較できない可能性があることを意味している。



2,3-ジヒドロキシ安息香酸

図2 ナラ菌の生産する毒素

### (3) ナラ菌の毒素の確認と生成量

ナラ菌を培養した培地からの抽出物を精製した結果、植物組織に毒素活性を示す 2,3-ジヒドロキシ安息香酸を単離することができた(図2)。本物質は既報と同じ物質であり、本物質がナラ菌の生産する毒素であることが再確認できた。ナラ菌の毒素生産量を測定した結果、毒素生産量は菌株間で異なることが明らかになった。また、ナラ菌の宿主防御物質に対する抗菌物質耐性を測定した結果、菌株によって耐性の程度が異なっていた。このことから、ナラ菌の性質が成長速度や病原力だけでなく、毒素生産量や宿主抗菌物質耐性でばらつきがあると考えられた。これらの因子について病原力との相関を解析した結果、菌株の生育速度が病原力と最も相関関係があった ( $r = 0.674$ )。一方、菌株の毒素生産量と抗菌物質耐性は、病原力と弱いながら相関関係があったことから、病原力決定には様々な因子が複合的に関与している可能性が考えられた。

### < 引用文献 >

- Ichihara, Y., Yamaji, K., Nakashima, T., Kubono, T., An antifungal substance isolated from *Quercus crispula* sapwood inoculated with *Raffaelea quercivora*, International Forestry Review, 12, 2010, 397
- Kusumoto, D., Masuya, H., Ohmura, K., Kamata N., Virulence of *Raffaelea quercivora* isolates inoculated into *Quercus serrata* logs and *Q. crispula* saplings, Journal of Forest Research, 17, 2012, 393-396
- 杉山長洋、窪野高徳、佐々武史、ナラ類集団枯損に関与するナラ萎凋病菌の生産する植物毒素について、日本農芸化学会東北支部合同支部大会講演要旨集、2002、50

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

染谷汐織、原若輝、山路恵子、市原優、  
アカガシのナラ菌に対する抗菌物質、日  
本生態学会大会講演要旨集、63:P1-099、  
2016年3月20日～24日、仙台国際セン  
ター(仙台市)

市原優、升屋勇人、シラカシに発生した  
堅果菌核病、日本森林学会大会学術講演  
集、126:P1B183、2015年3月26日～  
28日、北海道大学農学部(札幌市)

市原優、中島忠一、升屋勇人、加藤厚、  
コナラ心材抽出物に認められた抗菌物質、  
日本森林学会大会学術講演集、125:L05、  
2014年3月26日～30日、大宮ソニック  
シティ(さいたま市)

原若輝、山路恵子、市原優、ブナ科樹木  
萎凋病におけるアカガシとマテバシイの  
防御物質の同定、日本生態学会全国大会、  
61:PB2-049、2014年3月14日～18日、  
広島国際会議場(広島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市原 優 (ICHIHARA, Yu)  
国立研究開発法人森林総合研究所・関西支  
所・グループ長  
研究者番号：10353583

### (2) 研究分担者

山路 恵子 (YAMAJI, Keiko)  
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号：00420076

升屋 勇人 (MASUYA, Hayato)  
国立研究開発法人森林総合研究所・東北支  
所・チーム長  
研究者番号：70391183