

令和元年5月21日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07766

研究課題名(和文) 樹木内生菌類を利用したナラ枯れ防止のための基盤研究

研究課題名(英文) Research for preventing Japanese oak wilt (JOW) disease with tree endophyte fungi

研究代表者

塩野 義人 (SHIONO, YOSHIHITO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：80361278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナラ菌 (*Raffaelea quercivora*) の植物毒性物質や代謝産物に含まれる成分のうち、植物に対して毒性を示す物質や培養抽出物に含まれる特徴的な代謝産物を明らかにすることを目的とした。その結果、ナラの木のおがくずを培地に添加した条件において、dioxotetrahydrofuro[3,4-b]furan 骨格を有する新規物質を生産することが判明した。また、レタスの幼根に対する阻害活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、明らかになっていないナラ菌の生産する植物毒性物質を探索することであり、明らかになった物質の構造から、生理活性試験や活性の予測を行い、ナラ枯れの萎凋メカニズムを解明する一つの手がかりとする。さらに、ナラ菌の生産する植物毒性物質の生産を抑制する作用を有する菌類を樹木内生菌類に求め探索し、新たなナラ枯れ抑制方法を提案することができる。

研究成果の概要(英文)：Among the components contained in phytotoxic substances and metabolites of *Raffaelea quercivora*, it was aimed to clarify the characteristic toxicity to plants and characteristic metabolites contained in culture extract. As a result, it was found that a new substance having dioxotetrahydrofuro [3,4-b] furan skeleton was produced under the condition where sawdust of oak tree was added to the medium. It also showed inhibitory activity against lettuce root.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：ナラ菌 *Raffaelea quercivora* Scytalone 植物内生菌 植物毒性

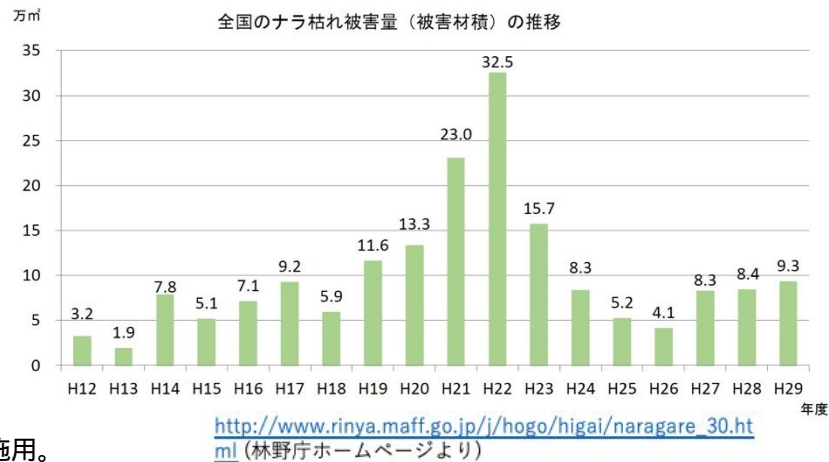
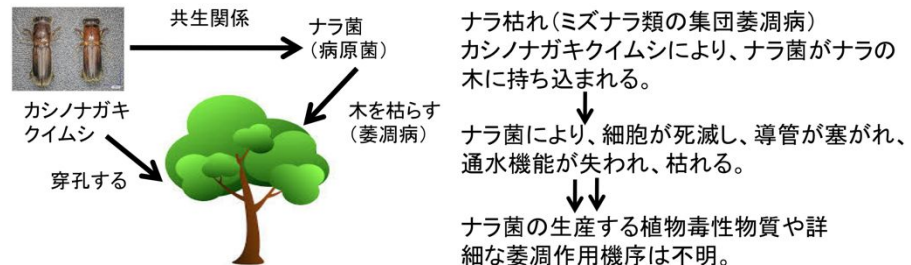
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カシノナガキクイムシが媒介するナラ菌 (*Raffaelea quercivora*) により、ミズナラ等が集団的に枯損する「ナラ枯れ」が発生している。平成 27 年度の全国のナラ枯れ被害量は、前年度より減少したが、一部地域では被害が増加している。拡大を続けるナラ枯れ被害に対して様々な防除法が考案されてきた。それらの防除法の大部分は病原菌であるナラ菌よりも、その伝播者であるカシノナガキクイムシを標的にしている。次の二つの方法に大きく分けられる。

#### (1) 枯れた被害木からのカシノナガキクイムシの脱出を阻止する方法

- ・プラスチックシートによるカシノナガキクイムシが繁殖する枯死木の幹を被覆
- ・枯死木を伐採し、丸太に切り分けてから林外に持ち出して、消去処分したり、ビニールで被覆し、燻蒸殺虫剤を施用。



#### (2) 飛来するカシノナガキクイムシの穿孔被害から守る方法

- ・ビニールシートで健全木の幹を被覆
- ・フェロモントラップや衝突トラップによりカシノナガキクイムシを捕獲して被害を免れるさせる方法

実際の防除現場においての問題点： 枯死木の伐採は危険の重労働、燻蒸剤の使用後のビニールシートの処理、被覆部以外からのカシノナガキクイムシの脱出や穿孔加害の報告など完全を期することは、容易でない。

申請者らは、これまで、ナラ菌に対する生育阻害作用を有する菌類を健全なナラの木より探索し、ポリケチド誘導体を明らかにしてきた。すなわち、ナラの木の中にナラ菌の生育阻害する菌類が生存していることを明らかにし、微生物農薬としての可能性を示すことができた。これらのことを背景にこれまでに、明らかになっていないナラ菌の生産する植物毒性物質の探索を中心に研究を行なった。

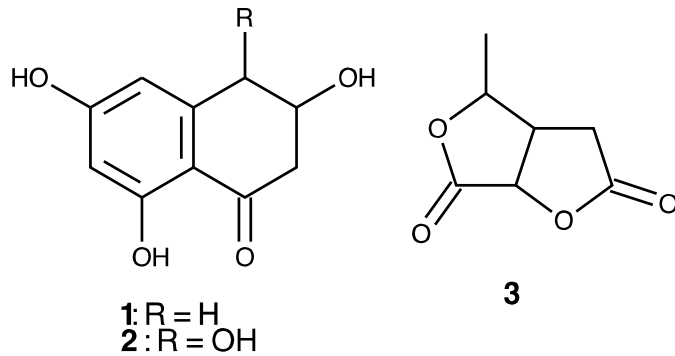
### 2. 研究の目的

ナラ枯れにより引き起こされるダメージは、環境的被害に加え、ナラ枯れ枯死木の廃棄に要する莫大な費用などが考えられる。このような経済的被害を背景に、本申請では、不明のナラ菌の植物毒性物質の同定し、樹木内で共生している植物内生菌類から、ナラ菌の植物毒性物質の生産を阻害する菌類を明らかにし、環境にやさしく、樹木に対する微生物農薬の開発の基盤

の一助となすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

数種類の培養培地を用いて、ナラ菌 (*Raffaelea quercivora*) の培養物より、植物毒性物質の探索することを目的とし、植物内生菌類より、ナラ菌の生育と植物毒性物質の生産の有無をあわせて、活性を示す菌類を選別することを目的に行った。まず、ナラ菌を次に示す各種微生物の培養培地で培養した。( : 麦芽エキス培地:麦芽エキス:4%, グルコース:4%, ペプトン:1.0%, 水, 培養条件:21 日間、25 度で振盪培養、 : 玄米固体培地:組成:玄米、水, 培養条件:30 日間、25 度で静置培養、 玄米固体培地:組成:玄米、ナラの木のおがくず(1%)、水、培養条件:30 日間、25 度で静置培養)。次に、それぞれの培養物について(菌体とろ液)、各種溶媒分画について、濃縮し、TLC や HPLC を用いて、代謝産物について分析することにより、どのような物質が生産されているかどうかを調べた。また、レタスの種子を用いた発芽試験や幼根伸長阻害活性についても、得られた抽出物に対して行った。

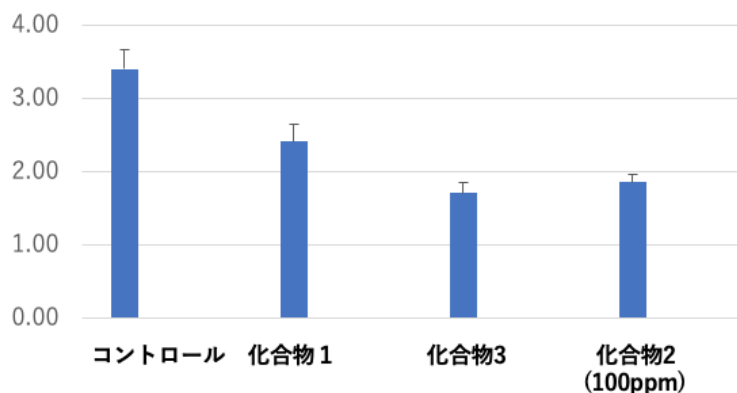


その結果、 の玄米固体培地を用いた培地において、数種な顕著な物質の生産性が見られた。続いて、各種カラムクロマトグラフィー、HPLC 分取などを組み合わせて、これらの物質精製し、三種の化合物 1 と 2, 3 を単離した。化合物 1 は、<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルによる分析を行った。まず、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルからは、それぞれがカップリングしたベンゼン環メチンに帰属される二種のシグナルが観測された。また、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルからは、10 本のシグナルが観測された。カルボニル基や二個の *sp*<sup>3</sup> メチレン、一個のメチンに帰属されるシグナルが観測された。続いて、二次元 NMR スペクトルの HMBC 実験をより、得られた相関により、部分構造を繋ぎあわせて、1 の 平面構造を明らかにした。その結果、化合物 1 は既知のシタロンで有ることが判明した。一方、化合物 2 については、<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータより、1 に水酸基が付加した類縁物質であると判明した。詳細な解析の結果、2 は、4-ハイドロキシシタロンであった。これらは、植

物に対する毒性は示さないものの、抗菌活性を示した。化合物 3 についても、<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータを中心に同様の構造解析を行った。高分解能質量分析より、分子式を決定した。NMR スペクトルデータ分析より、ダブルットメチル基、メチレン、二個の

メチンに帰属されるシグナルが見られた。さらに、<sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータより、エステルに帰属される二個のカーボンが観測された。これらを HMBC スペクトルデータをもとにつなぎ合

単離物質のレタス根に対する伸長抑制活性



わせた結果、dioxotetrahydrofuro[3,4-b]furan 骨格を有する新規物質であることが判明した。

また、ナラ樹木より、植物内生菌類として分離した一系状菌株（未同定）とナラ菌を対峙培養した時（ポテトデキストロース寒天培地）、ナラ菌に対して、複数の黄色物質の生産を引き起こした。黄色物質の生産量が少ないことから、研究期間内に単離することはできず、その化学構造やその生産機構は明らかにはできなかつた。しかし、この植物内生菌株がナラ菌の生産する代謝産物のパターンを変化させる作用を有していることがわかつた。また、生物活性試験より、植物活性に活性を示した化合物 1,2,3 は生産されていないと予想された。このことは、植物内生菌類を用いることで、従来の化学物質を使用したナラ枯れ防除法以外に、将来、内生菌類を利用した微生物農薬を開発できる可能性があることを示した。

#### 4．研究成果

ナラ菌の植物毒性物質や代謝産物に含まれる成分のうち、植物に対して毒性の示す物質や培養抽出物中に含まれる特徴的な代謝産物を明らかにすることを旨として、異なる培養条件で培養した。その結果、ナラの木のおがくずを培地に添加した条件において、dioxotetrahydrofuro[3,4-b]furan 骨格を有する新規物質を生産することが判明した。また、レタスの幼根に対する阻害活性を示した。最後に、圃場試験の準備のために、幼苗を用いた試験を行う予定であったが、天候と時間の都合等で期間内には実施できなかつた。

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshihito Shiono, New antimicrobial active metabolites from endophytes, 2nd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences 2017 年(インドネシア)

Yoshihito Shiono, New antimicrobial sesquiterpens from an endophyte, Microdiplodia sp. TT-12, International conference on pharmacy science and practice, 2018 年(インドネシア)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。