

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580154

研究課題名(和文) ナラ類集団枯損の防除物質の探索とその利用可能性について

研究課題名(英文) Screening for antibiotic compounds against Japanese oak tree wilt disease and the availability

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナラ枯れはミズナラやコナラに対して、カシノナガキクイムシとナラ菌により引き起こされる樹木萎凋病であり、一部の地域では、現在もなお、被害の拡大が続いている。そこで、環境負荷の少ない防除方法開発の基盤研究として、ナラ枯れ病原菌に対する抗菌作用を有する微生物をナラの樹木内生菌類より探索した。その結果、分離系状菌 *Cytospora* sp. TTN-10と *Microdiplodia* sp. TT-12株の培養抽出物とブナシメジの培養菌糸体から、インテグラシン A、サイトスポロン N、13-ヒドロキシマクロフォリン A、2(E)-デセン-4,6,8-トリイン-1-オールを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Japanese oak wilt (JOW) is a tree disease caused by the fungus *Raffaelea quercivora*, which is vectored by the ambrosia beetle, *Platypus quercivorus*. In this study, 15 compounds were isolated from the endophytes, *Cytospora* sp. TT-10 and *Microdiplodia* sp. TT-12 isolated from JOW, and a culture of commercial edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*. Phomadecalin F, 8-monoacetoxypomadecalin D, 3-epi-phomadecalin D, 13-hydroxylmacroforin A were isolated from the culture of *Microdiplodia* sp. TT-12, 4,5-dihydroxy-3-heptylphthalide and named cytosporone E, integracin A, cytosporones N and A from *Cytospora* sp. TT-10, and 2(E)-decene-4,6,8-triyn-1-ol and decene-4,6,8-triyn-1-ol and 8(E)-decene-4,6-diyn-1,2,10-triol from a liquid culture of *Hypsizygus marmoreus*. Among them, integracin A, 13-hydroxylmacroforin A and 2(E)-decene-4,6,8-triyn-1-ol exhibited antifungal activity against the pathogenic fungus *Raffaelea quercivora* due to JOW.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：ナラ枯れ ナラ枯れ病原菌 植物内生菌 カシノナガキクイムシ 抗菌活性物質 きのこと

1. 研究開始当初の背景

ナラ枯れはカシノナガキクイムシが運ぶナラ枯れ病原菌の感染により、ブナ科のナラが集団で枯死する樹木伝染病である。ナラ枯れの被害地域は、日本海側を中心に拡大していたが、近年は減少傾向に有る。しかしながら、一部の地域では、今も、被害は続いている。ナラ枯れの作用機序は、病原菌が樹木内部で着色物質を生産し、導管を塞ぐことにより通水機能を奪い、枯死を引き起こすが、詳細は明らかにはなっていない。

一方、ナラ枯れ被害の防除には、立ち木の樹幹に薬剤を注入する方法や合成フェロモントラップを利用したカシノナガキクイムシの駆除、被害木の伐倒駆除などがあり、このような手法で被害の拡大を抑えている。本研究では、環境調和を考慮し、自然界よりナラ枯れ病原菌に対する生育阻害物質を探索した。

2. 研究の目的

森林の木々の内部に生息する植物内生菌類が多くの生理活性物質を生産していることがこれまでの調査で明らかにされている。そこで、このような植物内生菌類の持つ物質生産能力に着目し、その中から、宿主植物に対して優位に働く菌類を選別し、それらの生産する物質を精製し、単離し、新たなナラ枯れ防除手法としての可能性を調べることを目的とした。すなわち、ナラより植物内生菌類を単離し、ナラ枯れ病菌に対する生育阻害活性作用を有する内生菌類を探しだし、その菌類の生産する抗病原菌作用物質を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

健全なナラの木やナラ枯れ罹病木の表面を殺菌し、内部に生息する糸状菌類を分離し、得られた糸状菌の培養物について、ナラ菌に対する生育阻害活性を調べた。一方、市販の食用キノコ(シイタケ、エノキタケ、エリンギ、ブナシメジなど)より分離したキノコ菌系の液体培養物についても、同様にナラ菌に対する生育阻害活性試験を行った。さらに、得られた活性物質については、化学構造を解析し、それぞれについて、ナラ枯れ病原菌に対する抗菌活性を実施した。さらに、顕著な活性を示す物質については、野外使用の可能

性を調べる。

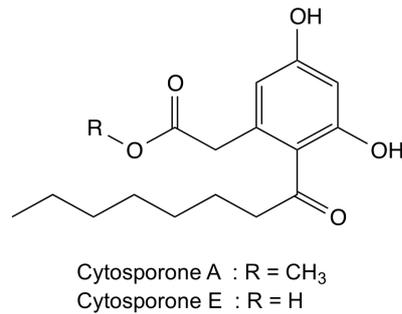
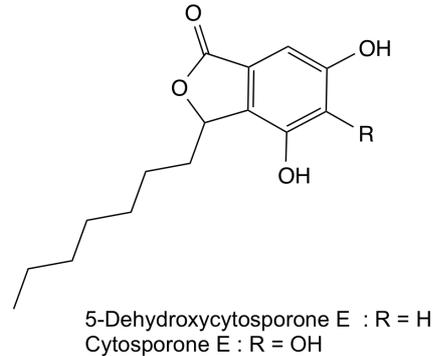
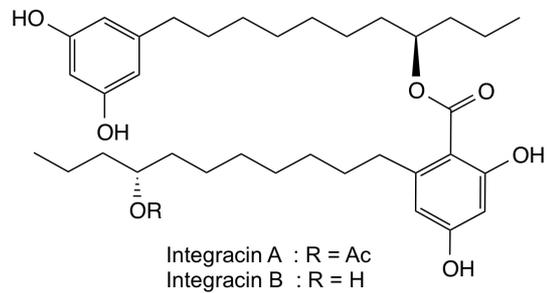


図 1.

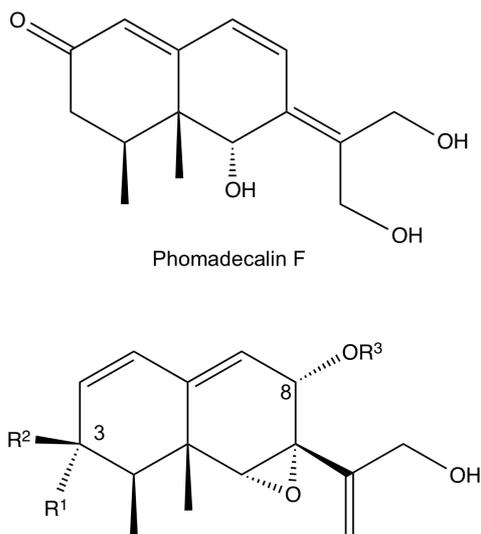
4. 研究成果

(1) スクリーニングより、ナラ枯れ罹病木より得られた糸状菌類 *Crytospora* sp. TTN-10 と *Microdiplodia* sp. TT-12, さらに、市販キノコのブナシメジより分離した菌系の液体培養物において、ナラ菌に対する生育阻害活性が示された。

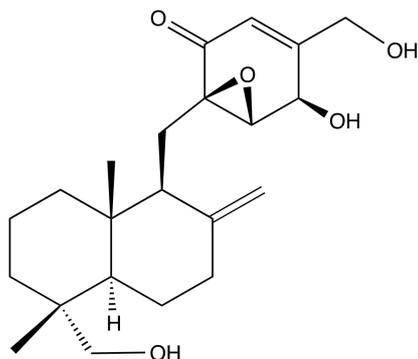
(2) *Crytospora* sp. TTN-10 の代謝産物について

TTN-10 株の個体培養物(玄米)のメタノール抽出物をナラ菌に対する活性試験と TLC 上での挙動を指標に、カラムクロマトグラフィーにより精製し、6 種の物質を単離し

た。それぞれは、NMR を中心とした構造解析の結果、新規物質として、5-dehydroxy-cytoporone E と、既知の integracin A, B, cytoporone A, N であることが分かった (図 1)。



8 α -Acetoxypomadecalin D : R¹ = OH, R² = H, R³ = Ac
 3-*epi*-Phomaecalin D : R¹ = H, R² = OH, R³ = H
 Phomadecalin C : R¹ = O, R² = O, R³ = OH
 Phomadecalin D : R¹ = OH, R² = H, R³ = OH



13-Hydroxymacroforin A

図 2.

(3) *Microdiplodia* sp. TT-12 の代謝産物について

TT-12 株の個体培養物のメタノール抽出物を先と同様の手法により、精製し、6種の化合物を明らかにした。それらの構造を解析した結果、新規物質として、phomadecalin F, 8 α -monoacetoxypomadecalin D, 3-*epi*-phomadecalin D, 13-hydroxylmacroforin A

を、既知物質として、phomadecalin C, phomadecalin Dを同定した (図 2)。

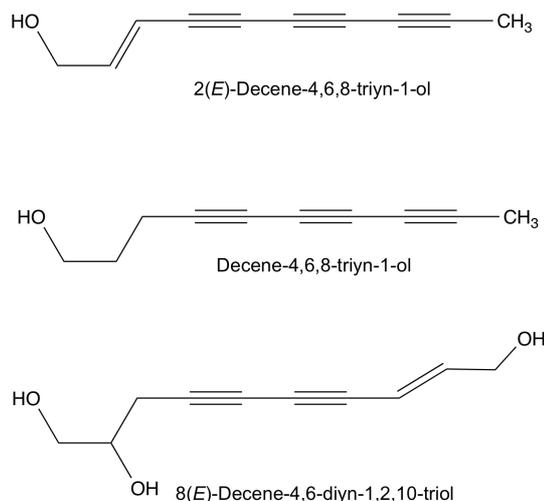


図 3.

(4) ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) の代謝産物について

6.0 L のブナシメジの培養菌糸体について、活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、3種の化合物を単離した。NMR を中心とした構造解析の結果、新物質の 8(E)-decene-4,6-diyn-1,2,10-triol と既知物質の 2(E)-decene-4,6,8-triyn-1-ol, decene-4,6,8-triyn-1-ol であった (図 3)。

(5) ナラ菌に対する生育阻害活性試験

分離菌 *Crytospora* sp. TTN-10 と *Microdiplodia* sp. TT-12, ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) の三種の菌類の培養物より単離した物質について、ナラ枯れ病原菌に対する生育阻害活性試験を行った結果、integracin A (12 mm / 30 microgram of disk), cytoporone N (14 mm/30 microgram of disk), 13-hydroxymacroforin A (12 mm / 50 of microgram disk), 2(E)-decene-4,6,8-triyn-1-ol (12 mm / 3 microgram of disk) に生育阻害活性を示した。それぞれの物質について、野外で、ナラ枯れ罹病木に対する作

用については、天候不順のため、評価できる結果は得られなかったが、ナラ幼苗に対する生育阻害は示さないことから、ナラ枯れ病原菌に対する抑制物質として、期待が出来る。

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2件)

Tomoya Takano, Takuya Koseki, Hiromasa Koyama, and Yoshihito Shiono. A New Cytosporone Derivative from the Endophytic Fungus *Cytospora* sp. Natural Products Communications, 9, 2014, 974-975. 査読有り
<http://www.naturalproduct.us/index.asp>

Yoshihito Shiono, Masatomo Haga, Hiromasa Koyama, Tetsuya Murayama, and Takuya Koseki. Antifungal Activity of a Polyacetylene against the Fungal Pathogen of Japanese Oak from the Liquid Culture of the Edible Mushroom, *Hypsizygus marmoreus*. Zeitschrift für Naturforschung B, 68b, 2013, 293-295. 査読有り
<http://www.znaturforsch.com/ab/v68b/2289-13.htm>

[学会発表](計4件)

発表標題: ナラ枯れ被害木より分離した糸状菌 TT-12 株の生産する物質について

発表者: 塩野 義人

学会: 日本農芸化学会 2015 年度大会

場所・日時: 岡山大学 (岡山県・岡山市) ・平成 27 年 3 月 26 日-29 日

発表標題: ナラ枯れの倒木より単離した糸状菌 TT-10 株が生産するナラ菌生育阻害活性物質について

発表者: 高野 智也(塩野 義人)

学会: 日本農芸化学会東北支部会第 148 回大会

場所・日時: 岩手大学 (岩手県・盛岡市) ・平成 25 年 10 月 26 日

発表標題: ブナシメジに含まれるナラ枯れ病原菌に対する生育阻害活性物質について

発表者: 芳賀 真倫 (塩野 義人)

学会: 日本農芸化学会 2013 年度大会、

場所・日時: 東北大学 (宮城県・仙台市) ・平成 25 年 3 月 24 日-28 日

発表標題: 食用キノコに含まれるナラ枯れ病原菌に対する生育阻害活性物質について

発表者: 芳賀 真倫(塩野 義人)

学会: 日本農芸化学会東北支部会第 147 回大会

場所・日時: 弘前大学(青森県・弘前市)・平成 24 年 10 月 26 日

[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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩野 義人 (YOSHIHITO, SHIONO)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 80361278

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: