

学 位 論 文 題 名

テンサイ 苗立枯病の生物防除に関する化学的研究

学位論文内容の要旨

テンサイの重要な土壌病害のひとつ苗立枯病は、*Rhizoctonia solani*や*Pythium ultimum*等の病原性糸状菌によって播種後から幼苗期にかけて発生する。本圃移植前の育苗床でこれが発生すると欠株による被害が大きい。現行のペーパーポット移植栽培では薬剤防除法が確立されておりほとんど問題にならないが、今後増加が予想される直播栽培ではその影響が大きくなると考えられ、また環境保全型農業のためにも、効果的な薬剤防除法とともに生物防除法の開発が望まれている。*Xanthomonas* sp. SB-K88株（以下SB-K88株）は、北海道農業試験場において見いだされた菌株で、テンサイの種子にコーティングすることによって、慣行の防除薬剤と同程度の苗立枯病抑制効果を発揮することから、生物防除資材として有望視されている。本研究はSB-K88株によるテンサイ苗立枯病の抑制機構の解明を目的としたもので、結果は以下の通り要約される。

(1) SB-K88株によるテンサイ苗立枯病の抑制機構の推定を試みた。苗立枯病菌*R. solani*、*P. ultimum*及び*Aphanomyces cochlioides*とSB-K88株の対峙培養を指標に抗菌活性物質生産による抑制、液体培養中あるいはSB-K88株処理したテンサイ栽培時に生成する揮発性物質による抑制、SB-K88株とテンサイの相互作用（抵抗性誘導及び発芽・生育促進）による抑制の可能性を検討した。その結果、SB-K88株の生成する抗菌活性物質による苗立枯病菌の増殖抑制が、発病抑制に結びついている可能性が最も高いと結論した。

(2) (1)の結果に基づいて、SB-K88株が生産する抗菌活性物質の単離・同定を試みた。培養濾液の処理方法、得られた活性画分の分画方法等の検討の結果、ポテト・スクロース液体培地（PS培地）を選択し、その培養濾液15 Lから、苗立枯病菌に対する抗菌活性を指標とし、各種クロマトグラフィーを駆使して分画精製を行い、*R. solani*及び*P. ultimum*に対して強い抗菌活性を示す物質xanthobaccin A（1; XB-A）、xanthobaccin B（2; XB-B）及びxanthobaccin C（3; XB-C）をそれぞれ133、35及び3 mg単離した。XB-AとXB-Bについて、2次元NMRを中心とした分光法による構造解析を行い、両者の主要部分を構成する炭素骨格をそれぞれ、tricyclo[7.3.0.0²⁷]dodecan-3-one及びtricyclo[7.3.0.0²⁷]dodecan-3-olと推定した。両者に共通した部分構造の解析結果は相対配置も含めて完全に一致した。XB-Cの構造は¹H-NMRスペクトルをXB-Aのものと

比較して推定した。また、XB-Aの主炭素骨格を形成するジカルボン酸（未単離）を別にxanthobaccinic acid（4; XB acid）と命名した。

(3) Xanthobaccin類は広い抗菌スペクトルを示すことが明らかにされた。特に、苗立枯病菌が属する卵菌類に対して強い抗菌活性を示したが、酵母、放線菌、細菌には抗菌活性を示さなかった。苗立枯病菌に対するXB-A及びXB-Bの寒天培地上での最小生育阻止濃度は*P. ultimum*及び*A. cochlidioides*に対して1-10 µg/mLであった。*R. solani*は、20 µg/mLでも生育は阻止されなかったが、10 µg/mL以上の濃度で菌糸の形態異常を引き起した。

(4) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるxanthobaccin類の定量法を確立し、SB-K88株の各種液体培地中での増殖とXB-A生産量に関して検討した結果、増殖の緩やかなPS培地で最もXB-Aの生産量が多く、増殖の速いKing's B培地等では生産量は少ない傾向が見られた。PS培地を用いて、SB-K88株の増殖とXB-A生産に及ぼす温度の影響を15、20、25℃の3段階で調べたところ、低温（15℃）では増殖がさらに緩やかになるものの、培養後期のXB-A生産量は25℃の場合の4-5倍に達することが明らかになった。

(5) 次にxanthobaccin類がSB-K88株による苗立枯病の抑制に関与していることの証明を、① SB-K88株をコーティングした（SB-K88株処理区）種子から育てたテンサイ幼苗の根圏抽出物からxanthobaccin類の検出及び定量、② 育苗温度とSB-K88株によるXB-A生成量、防除効果の相関の検討、③ SB-K88株処理区のテンサイ幼苗の根圏抽出物の抗菌活性の検出と活性本体の同定、④ 突然変異株のxanthobaccin類の生産性とそれらの苗立枯病抑制効果との相関の解析、の各方向から試みた。

5-1) 試験管育苗法を応用して、SB-K88株によるテンサイ幼苗根圏でのXB-Aの生産性を検討するため、幼苗の根圏抽出物をHPLCで分析したところ、SB-K88株処理区のテンサイ幼苗の根圏抽出物中からXB-Aが検出され、XB-AがSB-K88株によって根圏で生産されることが確認された。15℃で育苗した場合、播種後3日目ぐらいからXB-AがHPLCで検出されるようになり、5日目には1株の根圏抽出物中に約1.2 µg、10及び30日目にはそれぞれ約2.2及び3.1 µg検出され、根圏でのXB-A蓄積が確認された。

5-2) 根圏でのXB-A生産性に対する育苗温度の影響（15及び22℃）を検討した結果、培地中でのXB-A生産性と同様に根圏でのXB-A生産性も温度の影響を受け、低温条件で生産性がより高いことが判明した。この事実はテンサイの育苗が行われる低温期にSB-K88株による高い防除効果が得られる理由を、XB-A生産性の面からよく説明するものと考えられた。

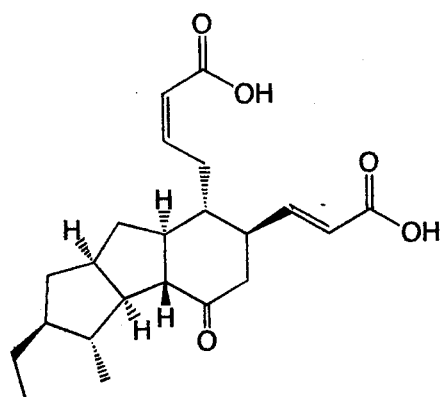
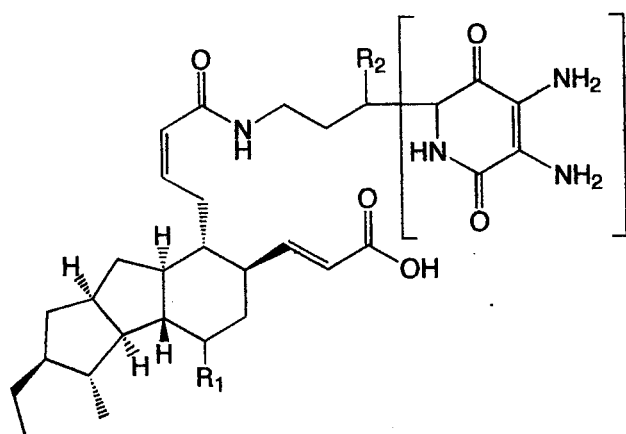
5-3) 根圏抽出物を、定量分析に準じたHPLC条件でXB-Aのピークとその前後に分別し、それぞれの画分について苗立枯病菌に対する抗菌活性を検討した。その結果、抗菌活性は主にXB-Aのピークに認められたことから、SB-K88株によって根圏で生産されたXB-Aは根圏抽出物が示す抗菌活性の主体であり、根圏において苗立枯病菌に

に対する抑制的効果を及ぼす主要因であることが明らかとなった。

5-4) SB-K88株の継代培養中に、親株であるSB-K88株に比べてPS液体培地中でのXB-A生産性が25%程度まで低下している変異株が数株得られた。これらの変異株とSB-K88株の苗立枯病抑制効果（立枯指数）の間には統計的に有意な差が認められ、SB-K88株のXB-Aの生産性が苗立枯病抑制効果と密接な関係にあることが示された。

(6) SB-K88株が苗立枯病抑制に卓効を示すことができる要因のひとつとして、そのテンサイ根圏での定着性に注目し、定着性に影響を及ぼす化学的因子として、SB-K88株が生産する苗立枯病菌以外の土壤微生物に対する抗菌活性物質の探索を行った。その結果、*Bacillus subtilis* に対する抗細菌活性物質やxanthobaccin類に対する感受性が低い *Alternaria* 属糸状菌に対する抗菌活性物質が生産されていることを明らかにした。これら物質の根圏あるいは種子圏での生産は未確認であるが、SB-K88株が根圏においてxanthobaccin類と同様にこれらの物質を生産し、一部の土壤微生物を排除して生態的地位を確立し、持続的にxanthobaccin類による苗立枯病の抑制効果を発揮していると推測された。

(7) 以上の結果を総合的に判断して、SB-K88株によってテンサイ幼苗根圏で生産されるxanthobaccin類が苗立枯病の抑制に重要かつ中心的役割を担っていると結論した。また、SB-K88株はxanthobaccin類と同時に抗細菌活性物質や他の抗糸状菌活性物質等、多様な抗菌活性物質を生産しており、これらが根圏の微生物相をSB-K88株に有利に制御することによってテンサイ幼苗根圏でのSB-K88株の優占的な地位が維持され、このことが結果的に苗立枯病の高い防除効果につながっていると推論した。



xanthobaccin A (1, XB-A; R₁: =O, R₂: OH)
xanthobaccin B (2, XB-B; R₁: OH, R₂: OH)
xanthobaccin C (3, XB-C; R₁: =O, R₂: H)

xanthobaccinic acid (4, XB acid)

Xanthobaccin 類の推定構造式（鍵カッコの中の構造は仮想的なものである）

学位論文審査の要旨

主査	教授	田原哲士
副査	教授	但野利秋
副査	助教授	小林喜六
副査	助教授	橋床泰之

学位論文題名

テンサイ苗立枯病の生物防除に関する化学的研究

本論文は和文で記され、図141、スキーム4、表76、引用文献109を含み、総頁数314からなり、内容は5章に分けられ、さらに英文概要が付してある。ほかに参考論文2編が提出されている。

テンサイ苗立枯病は*Rhizoctonia solani*や*Pythium ultimum*等の病原性糸状菌により、播種後から幼苗期に発生、本圃移植前の育苗床で発生すると欠株による被害が大きい。現行のペーパーポット移植栽培では薬剤防除法が確立されているが、今後増加が予想される直播栽培ではその影響が大きくなると考えられ、環境保全型農業のためにも、効果的な薬剤防除法とともに生物防除法の開発が望まれている。北海道農業試験場で分離された*Xanthomonas* sp. SB-K88株（以下SB-K88株）は、テンサイの種子にコーティングして播種すれば、慣行の防除薬剤と同程度の苗立枯病抑制効果を発揮することから、生物防除資材として有望視されている。本研究はSB-K88株によるテンサイ苗立枯病の抑制機構の解明を目的としたもので、以下に要約される結果を得ている。

(1) SB-K88株によるテンサイ苗立枯病抑制機構の推定を目的に、苗立枯病菌*R. solani*、*P. ultimum*及び*Aphanomyces cochlioides*の増殖抑制を指標に、SB-K88株が培地中に生産する抗菌物質、揮発性物質、テンサイの誘導的抗菌物質等による抑制の可能性を検討し、SB-K88株の生成する抗菌物質が苗立枯病菌の抑制に主として機能していると結論した。

(2) ポテト・スクロース培地 (PS培地)を用い、培養濾液15 Lから、苗立枯病菌に対する抗菌活性を指標にして、三種類の抗菌活性物質xanthobaccin A (1; XB-A, 133 mg)、xanthobaccin B (2; XB-B, 35 mg) 及びxanthobaccin C (3; XB-C, 3 mg) を単離した。2次元 NMRを中心とした構造解析を行い、XB-AとXB-Bの主要部分を構成する炭素骨格をそれぞれtricyclo[7.3.0.0²⁷]dodecan-3-one及びtricyclo[7.3.0.0²⁷]dodecan-3-olと推定した。XB-Cの構造は¹H-NMRスペクトルをXB-Aのものと比較して推定した。

(3) Xanthobaccin類は糸状菌を中心に広い抗菌スペクトルを有し、特に、苗立枯病菌が属する卵菌類に対して強い抗菌活性を示したが、酵母、放線菌、細菌への抗菌性は小さかった。XB-A及びXB-Bの寒天培地上での最小生育阻止濃度は*P. ultimum*及び*A. cochlidioides*に対して1-10 µg/mLであった。*R. solani*の生育は20 µg/mLでも阻止されなかったが、10 µg/mL以上の濃度で菌糸の形態異常を引き起した。PS培地で、SB-K88株のXB-A生産に及ぼす温度の影響を調べたところ、15℃では、培養後期のXB-A生産量は25℃の場合の4-5倍に達した。

(4) SB-K88株による苗立枯病の抑制にxanthobaccin類が関与していることの証明

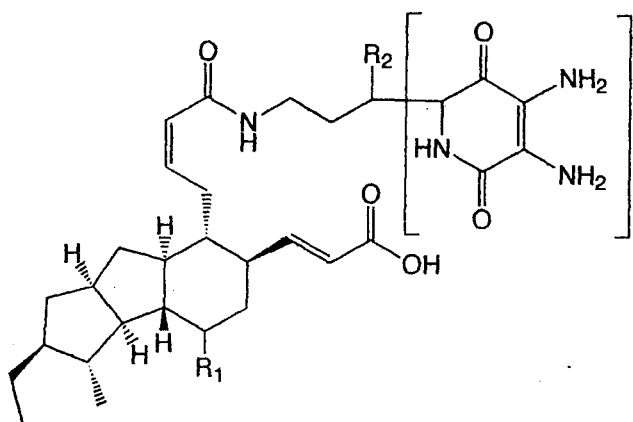
① SB-K88株でコーティングしたテンサイ種子を15℃で試験管育苗法で育てると、XB-Aが播種後5日目には1株の根圏抽出物中に約1.2 µg、10及び30日目にはそれぞれ約2.2及び3.1 µg検出された。また、抗菌活性のある根圏抽出物を液体クロマトで、分別したところ苗立枯病菌に対する抗菌活性はXB-A部分に局在していた。

② テンサイ根圏でのXB-A生産性に対する育苗温度の影響（15及び22℃）を検討し、低温条件で生産性が高いことを明らかにした。この事実は、SB-K88株のテンサイ苗立枯病防除効果が低温期に高いことをよく説明すると思われた。

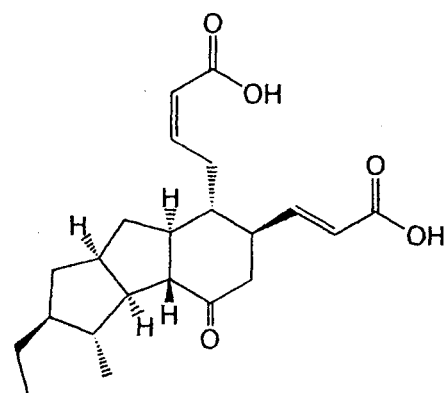
③ SB-K88株に比べXB-A生産量が低下した変異株を用いて、xanthobaccin類生産量と苗立枯病抑制効果の相関を解析したところ、両者に密接な関係が見いだされた。

(5) SB-K88株のテンサイ根圏での高い定着性に注目、SB-K88株が生産する苗立枯病菌以外の土壤微生物に対する抗菌活性物質の探索を行い、*Bacillus subtilis*や*Alternaria*属糸状菌に対する抗生物質が同時に生産されていることを見いだした。SB-K88株はこれらの物質により一部の土壤微生物を排除して生態的地位を確立し、持続的に苗立枯病菌を抑制していると推論した。

以上のように、本研究はテンサイ苗立枯病菌に対して*Xanthomonas* sp. SB-K88株の示す顕著な抑制作用のメカニズムを広い視野から検討し、SB-K88株が生産し、抑制現象に主たる寄与をしていると判断された新しいタイプの抗菌活性物質を単離、部分構造を解析し、それらの機能を実証したもので、生物防除の化学的基礎を解明し、天然物化学的にも興味深い成果を得ている。また、SB-K88株が他の土壤微生物を部分的に排除しテンサイの根圏で生態的地位を確立して、効果的かつ持続的に苗立枯病菌を抑制することを可能にさせていると予想される抗菌、抗細菌活性物質を同時に生成していることを発見、その意義を論じており、この分野の研究に生態化学的視点を導入、その有効性を示唆したことは高く評価される。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者中山尊登は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。



xanthobaccin A (1, XB-A; R_1 : =O, R_2 : OH)
 xanthobaccin B (2, XB-B; R_1 : OH, R_2 : OH)
 xanthobaccin C (3, XB-C; R_1 : =O, R_2 : H)



xanthobaccinic acid (4, XB acid)

Xanthobaccin 類の推定構造式（鍵カッコの中の構造は仮想的なものである）