学会受賞論文

(業績賞・研究)

化学生態学に基づいた植物病原菌および 脱窒細菌の代謝制御に関する研究

橋 床 泰 之*

北海道大学・大学院農学研究院

(2017年6月12日受理)

Studies on metabolic regulation of denitrifying bacteria and phytopathogenic microorganisms using chemical agents found in chemical ecology-based phenomena

Yasuyuki HASHIDOKO

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9 Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

Keywords: biocontrol agent, anti-bacterial rice seedling blight, tropolone biosynthetic inhibitor, excessive hyphal branching factor, sporulation-inducing factor.

はじめに

我々が目にする陸生生態系では、同種のみならず異種生物同士が、シグナル伝達を介しての多様なコミュニケーションネットワークを形成している。これには同調や協調、共生、同化のほか、抑制や排除、無害化など、生態系の安定性を保つ種々の機構が含まれている。これら生物の行動や応答について、生物間相互作用を仲介する化学物質の視点から切り込み、現象を解明しようとする学問領域を化学生態学と呼ぶ。古くは古代ギリシャのクログルミの樹下では作物が生育しにくいアレロパシー現象の報告や、江戸時代の有名無名の篤農家の人々が開発してきた連作障害や病虫害回避法など、多くの経験的知識として知られるものが多い。このようなアレロケミカルと呼ばれる化学シグナル物質を介した生物間相互

作用を現代科学の一学問分野にまで昇華させたのがJ. B. ハルボーンの名著、「Introduction to Ecological Biochemistry, 和訳名, 化学生態学への招待 (1977年)」である¹⁾。この著書でも示されているように、現象に基づく化学シグナル因子の探査・発掘で得られる化学物質は、生物の行動や代謝機構を生物合理的に制御しようとするIntegrated Pest Management (IPM, 総合防除)において重要な役割を果たしているケースが多い。さらには、農薬開発の基盤を担う重要なアプローチのひとつとしても認知されている²⁾。

我々の研究室では、難防除植物病原菌や亜酸化窒素(N_2O)放出細菌などの制御を対象に、生物資材としての拮抗細菌とそれらが産生する微生物代謝制御物質の探索を行ってきた。また、 N_2O 生成抑制活性の有無を検定できる擬似土壌での培養アッセイ系を組み上げ、同時に、バイアルに封入した土壌からの N_2O 放出を検定するアッセイ系も構築した。緑肥や土壌燻蒸資材として用いられる植物の二次代謝産物、さらには圃場に抵抗なく散布できる農薬、特に電子伝達系阻害タイプの除草剤等をこれらのアッセイ系にかけ、抑制

* 〒060-8589 北海道札幌市北区北9条西9丁目
E-mail: yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp
© 日本農薬学会

Fig. 1. Chemical structures of the main chemicals described in this study.

効果の強いものを見出そうとした。加えて、*Bacillus*属細菌の芽胞形成誘導物質をオカラ抽出物から単離精製し、その同定を試みると共に、類似化合物の活性を広く見た。ここではそれらの研究の一端を紹介し、現象からの農業科学と生物制御のための資材探索法開発、さらにはそれらの応用展開について触れたい (Fig. 1)。

1. 理想的な生物農薬資材としての資質と新規探索源の開発

微生物を生物農薬資材として活用する試みは古くからなされてきたが、これらの宿主近傍での定着能や病原性微生物と対峙したときの化学制御因子産生増進能など、目的にかなう生態学的振る舞いまで考慮されたスクリーニングで拾われたものは多くなかったように推察される。では何をもってスクリーニングに臨むか？もちろん、土壌伝播性の植物感染性微生物に高い拮抗性を示す微生物農薬候補資材として重要な諸性質のうち、病原菌に対する拮抗性（およびその化学的因子産生能）はその根幹をなすものである。しかしながら、作物の根という土壌生態系に組み込まれた微環境では、それ以上に重要な要素として、特に以下の3点を挙げることができる。それらは、1) 根での定着性、2) 病原菌が産生するトキシン類に対する耐性あるいは不感受性、そして3) その拮抗性微生物自身の対植物無害性、の3点である。特に1) と2) は、比較的に見過ごされやすかったように思われる。

根圏微生物や葉面着生菌の挙動あるいは菌相を観察していると、植物と微生物には、「相性」の良し悪しがあることに

否が応でも気づかされる。我々が研究対象とした中強酸性土壌のイネ根面にはその根面環境に適応した細菌群が優占しており³⁾、また、日本の中性施肥水田で栽培されたイネ根面ならば中性で肥料分の多い根圏環境に適応した細菌群が芽生えから収穫期まで常在する。イネのみならず、多くの作物の根圏では、高頻度で出現する特定の微生物が存在するものと考えられ、そのような根圏あるいは葉面微生物から土壌伝播性植物病原菌に対して強力な拮抗性をもつものを見いだせば、微生物農薬資材として実用化する目は十分に出てくるであろう。

我々はインドネシア・中央カリマンタンの硫酸酸性土壌に栽培されている水稲ローカルバラエティの根圏から多くの酸性耐性細菌を分離し、これらの多くが *Sphingomonas* 属細菌、*Burkholderia* 属細菌、ならびに *Flavobacterium* 属細菌であることを明らかにしていた⁴⁾。これらの細菌は、強烈な酸性土壌（湛水期で pH 3.2–3.8 の水、落水期の土壌では pH 2.1 におよぶ強酸性土壌）で水稲根の生存を可能にする微環境中和能力をもち、根に対する親和性と不可給態リン酸および窒素を供給する能力、さらには根の機能を停止させない無害性を兼ね備えていることを確認してきた⁵⁾。このような性質を持ったものに植物病原菌抑制能を見出すことができれば、まさに「無敵」の根面着生微生物が得られると期待した。インドネシアの強酸性水田での機能性微生物探索に関わったことで、スクリーニング用の菌株ライブラリーは構築できた。次なる問題は、何を防除対象に据えるかである。

2. イネ苗立枯細菌病拮抗細菌とその二次代謝産物の研究

イネ苗立枯細菌病は *Burkholderia plantarii* 強毒性株によって引き起こされ、苗の黄化、萎縮、色素沈着、枯死が集団的に発生する。強毒性 *B. plantarii* が産生するファイトトキシンは、3価鉄と強くキレート結合し周辺を鉄欠乏に至らしめる7員環性芳香族化合物、トロポロン (1) であることが知られている⁶⁾。このファイトトキシンは、イネのみならず真菌や細菌に対しても強い毒性を示し、宿主イネ芽生えのみならず、根圏周辺の微生物群集をも強力に排除する。上述したように、トロポロンの強力な毒性は鉄イオンに対する強力なキレーション能にあるため、いくら強力な抗生物質生産微生物を投入しても、それがトロポロンという単純かつ強力な抗生物質に対して感受性を示せば、それら抗生物質生産微生物といえどもその性能を発揮する以前に完全に死滅し、排除されてしまうであろう。したがって、イネ苗の坪枯れを引き起こす植物病原菌として1982年に突如として出現し、種子伝播性のため既存の薬剤がほとんど効かないこの病原菌を実証モデルに、イネ根への定着性とトロポロン耐性をもつ拮抗微生物の探索を開始する意味は大きいと考えた。

手始めに、上述したトロポロンの強い毒性に対して耐性を有し、しかもトロポロン生合成を停止させる微生物資材をインドネシア・中央カリマンタン州および南カリマンタン州の熱帯泥炭地の酸性耐性植物や中強酸性水田のイネ根圏から分離した微生物ライブラリーから探索した。酸性環境に強く、鉄分が極端に不足する中強酸性熱帯泥炭土壌や溶脱が進んだ酸性硫酸塩水田土壌で生育するイネの根圏微生物は鉄を奪うトロポロンに対する感受性が低いのではないかと考えたからである。検索の結果、幾つかの菌株は強力な病徴発現抑制を、別の幾つかの菌株は *B. plantarii* だけを接種したイネよりも強烈的な病徴を発現させた。もちろん、これらの菌株は、*B. plantarii* を共接種しない単独接種では、病徴発現やイネ芽生え生育阻害は全く認められない菌株であった⁷⁾。

B. plantarii による病徴発現に対して強力な拮抗作用を示した菌株901-5Bは、*Burkholderia mimosarum* と同定され、この菌株を共接種したイネ苗では、地上部、地下部ともに強力な病徴発現抑制が認められた。さらに、イネ苗を培養したジェランガムをベースとしたホーグラント無機塩溶液固化培地では、本菌株の共接種によってイネ苗立枯細菌病による根の伸長抑制が劇的にキャンセルされた。特筆すべきことに、この拮抗細菌は *B. plantarii* 自体を排除せず、病徴発現を完全に抑制していることが分かった⁸⁾。この極めてドラステックな現象について、その分子機序解明を目指したが、大まかな全体像を化合物ベースでつかむには10年を要した。残念ながら、インドネシアの酸性土壌植物根圏から分離したこれら細菌株は、日本の水田圃場や一般温室での防除試験が

許可されず、その研究は頓挫してしまった。

2010年、同じアプローチを北海道の水田で集めた微生物分離株で再開した。この時はトロポロン耐性のある微生物をあらかじめ1次スクリーニングで篩にかけておき、高いトロポロン耐性を示す株のみを、ジェランガムベッドで生育させたコシヒカリ苗を用いた病徴発現抑制試験に供する戦略を立てた。ここで問題になったのは、トロポロンが試薬として高価なことであったが、幸いなことに、トロポロンの毒性はその強い鉄キレート能による鉄欠乏にあることがわかっていたため、同じ鉄キレート能をもつ安価なカテコールを高価なトロポロンに代えて用い、スクリーニングを開始した。

ポテト・デキストロース (PD) 寒天平板に添加するカテコール量を増やしながら、点接種した分離菌株183株の耐性を検定していくと、5mM濃度で生育可能な株数が激減したが、それでも16株 (真菌4株、真正細菌12株) が10mMカテコールに、最も高い耐性を示した真菌PS1-7株では20mMカテコールに耐性を示した⁹⁾。この小集団から、抗イネ苗立枯細菌病効果を示す *Burkholderia heleia* PKA1-2株を見いだした。*B. heleia* PKA1-2株が産生するトロポロン産生抑制因子を、簡易トロポロン産生検定法として開発した菌体混ぜ込み・鉄含有寒天平板培地を使ったペーパーディスク法によって追跡し、単離精製した活性化合物をインドール3-酢酸 (IAA, 2) と同定した。IAAは、1 μ mol/ディスクで *B. plantarii* のトロポロン生成を強く抑制した¹⁰⁾。

いくつかのインドール核をもった誘導体にIAAと類似のトロポロン産生抑制活性があるか否かを調べたが、IAA以外は全く活性を示さなかった。また、IAAを含めたインドール誘導体は、菌体増殖にはほとんど影響を及ぼさなかった。これら化合物の中にはIAA様活性を示すものも含まれていたため、オーキシン活性とトロポロン産生抑制活性とはリンクしないと考えられた¹⁰⁾。

トロポロンの生合成経路についてはThielらが2010年にL-フェニルアラニンからフェニル酢酸 (PAA, 3) を経て生成する経路を報告している¹¹⁾。我々の研究室でも、*B. plantarii* に芳香環上のプロトンにジテリウムに置き換えたL-[ring-²H₅]-フェニルアラニン¹²⁾を1mM添加した培地で培養し、その培養上清から重水素ラベリングされたトロポロンとフェニル酢酸を同定した。したがって、*B. plantarii* もフェニル酢酸を直接の前駆体とするトロポロン生合成経路を有することが明らかになった¹⁰⁾。

このフェニル酢酸の構造式を眺めていて、IAAとの構造類似性に気がついた。そのため、今度はいくつかのPAAアナログ化合物を集め、それぞれの化合物に対し100mMから順次希釈した各容液を10 μ L/discでチャージしたものを上述したペーパーディスク試験にかけ、トロポロン生成阻害活性をスクリーニングしてみた。その結果、2-メチルフェニル酢酸 (4) の (R)-体、(S)-体両方と *p*-イソプロピルフェニル酢酸

Fig. 2. Estimated interference of the tropolone biosynthetic pathway of *B. plantarii* by indole-3-acetic acid and its analogous compounds.

(5) に強いトロポロン生成阻害活性を確認した。これらトロポロン産生阻害活性を示すフェニル酢酸アナログ化合物に曝露させた *B. plantarii* 代謝産物を追跡したところ、インドール酢酸添加した培地では中間体PAAの蓄積自体が抑制され、(S)-あるいは (R)-2-メチルフェニル酢酸と *p*-イソプロピルフェニル酢酸をそれぞれ添加では逆にPAAが蓄積した。したがって、前者では脱アミノ反応を含むPAA生成経路が阻害され、後者ではPAAの脱炭酸とベンゼン環の7員性芳香環への再構築経路が阻害されていると考えられる (Fig. 2)¹⁰。

なお、*B. mimosarum* 901-5B株と *B. heleia* PKA1-2の両株はそれぞれ *B. plantarii* のトロポロン産生を抑制するものの、*B. plantarii* 菌体自体の生育を阻害することはない、極めて寛容な形でイネ苗立枯細菌病を抑制している。したがって *B. heleia* PKA1-2株共存下では、*B. plantarii* だけが爆発的に増えることもない。このことは、苗代によるかつてのイネ育苗法は、イネ芽生え根圏に多様な土壌細菌群とモミ付着細菌群のコンソーシアム形成を促し、*B. plantarii* の暴走を決して許してこなかったことを示唆している。我々が見出したイネ苗立枯細菌病発病抑制機構は、「化学生態学に基づいた」イネ苗立枯細菌病防除研究の成果と言えるであろう。

3. イネ苗立枯細菌病拮抗トリコデルマ真菌とその二次代謝産物の研究

スクリーニングに供したイネ根圏微生物のうち最も高いカテコール耐性 (20mM) を示した真菌 *Trichoderma* (*Hypocrea*) *virens* PS1-7株も、イネ苗立枯細菌病の病徴発現を強く

抑制した。また、この真菌から、カテコール曝露という化学ストレスで誘導される分生子形成促進因子を単離した。思いがけず、この化合物はハマナスで慣れ親しんだダウカン型セスキテルペン骨格をもち¹³、9,10-位にアルコール性水酸基をもつセスキテルペンジオール (CAF-603) (6) であった。面白いことに、この化合物の7位のダウカン骨格立体化学はハマナスや多くのセリ科植物で知られているS体ではなく、R体であった¹⁴。そのため、ハマナスやセリ科植物が保有するファルネシル2リン酸環化酵素とは明らかに異なる環化酵素を持っているらしい。我々はまた、ディファレンシャルPCR法により、このセスキテルペンジオール生合成のボトルネック遺伝子がFPP環化酵素のものであることを明らかにしている。さらに、PS1-7株のカテコール曝露による遺伝子発現レベルの変動に関するデータがRNA-seq解析によって得られており、PS1-7株の環化酵素の塩基配列も明らかにになっているため、今後の展開に注力してゆく予定である。

一方、*B. heleia*と同様、ジェラン平板を用いたトロポロン生成抑制試験でPS1-7株が産生するトロポロン生合成抑制活性物質を追跡したところ、活性物質本体はこのセスキテルペンジオールだった。この化合物が200 μ M存在する培地では、トロポロン産生量は1/3程度まで低下した。この真菌代謝産物は、*B. plantarii* に対し強力な擬似バイオフィーム形成誘導活性を示したが、通常に形成されるバイオフィームとは異なり、菌体外多糖の粘性物質内の菌体は短期間のうちに大部分が死滅した。したがって、IAAとは明らかに異なった *B. plantarii* 抑制機構が働いていると判断される¹⁵。

分生子形成誘導因子およびトロポロン生成抑制物質として単離同定し、我々がカロト-4-エン-9,10-ジオールと呼んでいるダウカン型セスキテルペンジオール (6) は、培地中に添加するカテコールあるいはトロポロンの濃度に比例して菌体外放出量が上昇する化学ストレス応答性化合物であることがわかった。その産生量は、1.0mM カテコール添加ポテト・デキストロース液体培地中、3日間培養で 13mgL^{-1} であった。抗真菌活性や殺細菌活性自体は弱いものの、この化合物6は *T. virens* PS1-7株自身に分生子形成を誘導し、また、*B. plantarii* のトロポロン産生抑制や擬似バイオフィーム形成亢進に対する活性をも有していた。この化合物がどのような目的で産生されてくるのか、その興味は尽きないところである。筆者にはまた、学位論文のテーマにもなったダウカン型セスキテルペン化合物群の研究にほぼケリを付けた1992年から20年を経て、思いがけない再会を果たした同じ骨格をもった化合物でもある。この“20年目の再会”によって、一連の研究は自身には強く印象に残るものとなっている。

4. テンサイ苗根腐病卵菌拮抗 *Pseudomonas jessenii* の二次代謝産物の研究

ヒユ科作物に根腐病を引き起こす卵菌 *Aphanomyces cochlioides* は、我々の研究室が「農薬化学研究室」と名乗っていた頃からの研究テーマで、特に遊走子の宿主認識因子としてコクリオフィリンAと名づけられたB-環無置換フラボンを見出すなど、多くの研究成果が積み重ねられている¹⁶⁾。最近も、我々の研究から *A. cochlioides* 遊走子がcAMPに強く反応して活発に運動し、AMPシクラーゼ賦活化剤で遊走子形成密度が倍以上に高まることや、アデニンが遊走子のコクリオフィリンAに対する誘因をキャンセルさせることなどを明らかにしている¹⁷⁾。

この土壌伝播性卵菌に対して拮抗性を示す根圏微生物を探索した。*A. cochlioides* 宿主になる植物（ホウレンソウ、テンサイ、アカザ、ケイトウの一種）とともに、同じ畑地環境で栽培された作物や、周辺で雑草として自生しているいくつかの植物の根を採取し、それぞれの根圏から根圏微生物を分離した。得られた分離株、計150株を *A. cochlioides* との対峙培養にかけたところ、8株の菌糸生育阻害株を得た。そのうち、ホウレンソウ根圏から分離した *Pseudomonas jessenii* EC-S101株は、対峙した *A. cochlioides* 菌糸の異常な分岐亢進を誘導した¹⁸⁾。

この菌糸分岐亢進因子をとらえるべく、*Pseudomonas jessenii* EC-S101株をPD液体培地で震盪培養し、得られた菌体培養上清をペーパーディスク試験に供したが、分岐誘導活性は全く認められなかった。ところが、PD寒天平板上でこの菌株を培養したあとの寒天片あるいはそのMeOH抽出物を同様にペーパーディスク試験にかけたところ、対峙培養での対峙菌糸先端の異常分岐誘導が見事に再現された。そのた

め、平板培地で本菌株を培養しなければ、目的の活性物質は得られないことがわかった。

活性成分の単離精製は力仕事になった。7.5LのPD寒天培地を30mLずつ分注した250枚のプラスチックシャーレ平板すべてに *P. jessenii* EC-S101株菌体懸濁液を塗布し、2日間、25°C暗所で培養した。この寒天培地を凍結後、速やかに溶解させ、木綿布で絞り、残った残渣にはさらに1.5LのMilli-Q水を加え、再度圧搾した。この操作で得られた、合計5.5Lの培養液を遠心分離で除菌後、上清を同容量の酢酸エチルで3回ずつ抽出し、ようやく計250mgの粗抽出物を得た。これをシリカゲルカラムとHPLCで精製し、*A. cochlioides* 菌糸に対して異常分岐亢進を誘導する活性物質Aを30.4mg、活性物質Bを8.0mg単離し、それぞれの化学構造を(+)4,5-ジデヒドロアカテリン (7) およびそのアルキル鎖が2炭素原子分短いホモログ分子 (8) と決定した。主たる活性成分7は重量で粗抽出物の10%以上を占めていた。尚、後者は新規化合物であった¹⁹⁾。

この化合物を1μgチャージしたペーパーディスクに対峙させた *A. cochlioides* 菌糸は伸長阻害を呈し、有糸分裂を伴う菌糸先端の異常分岐と速やかな核崩壊をも再現性よく示した。したがって、これらの化合物が異常分岐を誘導する化学因子であると結論づけた (Fig. 3a)。卵菌は薬剤耐性を菌糸接合による遺伝子交換で薬剤耐性を獲得するが、この化合物に曝露した卵菌菌糸は厚膜胞子の形成が強く阻害されるため、この接合阻害は耐性菌出現阻止の面でも大きな意味をもつかもしいない。これらのフラノン誘導体は、紅藻 *Delisea pulchra* 表面にバクテリアが付着・感染できない現象を説明するクオルモンミミック分子、3-(1-ヒドロキシ)ブチル-4,6(Z)-ジプロモ-5-メチレン-2 (5H)-フラノン (9) と同じ炭素骨格を有しており、同様にクオルモンミミック分子として機能しているのではないかと推定した。

そこで、その応答をNBA平板上、強いスウォーミング能をもつ菌株として分離していた *Burkholderia cepacia* B株と、そもそもスウォーミングを呈さないEC-S101株自体を被験菌株として、それらの応答をみた。その結果、終濃度178μMでNBA平板に含ませた化合物7は、通常の培地では全くスウォーミングを示さないEC-S101株に対して、24時間培養で直径4cmに達するスウォーミングを誘導した。一方、*B. cepacia* B株に対しては、終濃度22μMでスウォーミングのみをほぼ完全に抑制することを見出した。

また、過剰分岐による形態変化についてその作用機作を知る目的で、フェロイジン-ローダミン試薬による菌糸のF-アクチン蛍光染色を試みた。正常細胞では均一にアクチンブランクが配置され、菌糸の形状を保つ機能を果たしているのに対し、菌糸先端ではフィラメント状のものが高密度で分布し、菌糸先端の伸長と可塑性が担保されている。それらに対し、異常分岐を起こしている菌糸では、ブランクの形

a) *Aphanomyces cochlioides* b) *Bacillus amyloliquefaciens*

Fig. 3. Morpho-differentiation-inducing and functional differentiation-inducing chemicals toward microorganisms and their appropriate concentrations. a) (+)-Didehydroacaterin (7) induced hyper-branching induction of *A. cochlioides* hyphae. Along this morpho-differentiation, cell mitosis and senescence of nuclei are accelerated. b) Diacetoneamine (12) induced sporulation of *B. amyloliquefaciens* vegetative cells. This event is highly linked to activation of cyclic lipopeptide antibiotic production, such as iturin A2.

成と配置が不均一で、プラーク自体も鮮明でなかった。したがって、(+)-4,5-ジデヒドロアカテルンによる卵菌菌糸異常分岐誘導の主たる原因のひとつがF-アクチンフィラメント形成阻害であることは間違いないであろう²⁰⁾。

5. N_2O 放出細菌をめぐる農業と微生物の関わり

生物が必須栄養素として要求する窒素は、多くの生物で有機物分解によって生じるアミノ酸あるいは無機態のアンモニア (NH_4^+ , 土壌にとどまりやすい) や硝酸アニオン (NO_3^- , 溶脱や脱窒を起こしやすい) として取り込まれ、利用されている。低窒素状態にある土壌では、植物や真菌は1) 単生窒素固定細菌との半共生関係を結ぶ、2) 積極的な有機物分解に関わる、あるいは3) 硝化細菌や硝化古細菌によるアンモニア硝化反応を生物学的に抑制するなどの戦略をとり、それぞれの可給態窒素を確保する。イネ科植物には根から硝化抑制活性をもつジテルペンやパラキノン誘導体を放出するものがあり、圃場における窒素ロス抑制への応用が期待されている。一方では、残念ながら硝酸アニオンからの脱窒反応を抑制する天然有機化合物はほとんど知られておらず、薬剤や植物二次代謝産物が N_2O 抑制に関わる例についての報告は極めて限られていた。

熱帯泥炭林地の開墾後、農地に転換した木質泥炭土壌は世界で最も強力な亜酸化窒素 (N_2O) 放出源になることで注目

Fig. 4. Repression of N_2O emission by incomplete denitrifiers that are missing N_2O reductase activity. For the N_2O emission assay, we used an excessive amount of KNO_3 (3.6 mg/mL) and 0.5 mg/mL sucrose-supplemented soft gel medium. In the gas-chromatographic vial, the culture was incubated at 20°C for 7 days in the dark. Although we reduced KNO_3 to be 1/10, N_2O emission-repressing activity of paraquat at 2.5 μM was clearly observed. All of the N_2O emitters were *Pseudomonas* sp. isolated from Shizunai corn farm soils.

されているが、現在、熱帯泥炭林開墾地での土地利用で最大の経済価値を生んでいるとされるオイルパームプランテーションでは、多量の化学肥料の投入を行っているにもかかわらず、その N_2O 放出量はサゴヤシ圃場や蔬菜栽培開墾地

に比べて極端に低い²¹⁾。そこで、オイルパームプランテーションで使用されている除草剤を含め、農地への散布に最も抵抗感のない除草剤のうち、脱窒阻害に関わる可能性がありそうな電子伝達阻害系薬剤のいくつかについて、 N_2O 放出抑制効果を調べてみた。

その結果、パラコート(10)が N_2O 高放出性 *Pseudomonas* 属細菌を接種したソフトゲル培地で $2.5\mu\text{M}$ 、黒ボク土壌 5g では $50\mu\text{M}$ という実用的低濃度で、それぞれ菌体増殖抑制を伴わず、高い N_2O 抑制効果を示した (Fig. 4)²²⁾。また、イソウロン(11)もパラコートに近い抑制効果が見出された。しかしながら、パラコートと同じ N カチオン型除草剤であるジクワットでは、硝化作用による N_2O 放出は抑制するものの、脱窒による N_2O 放出は全く抑制しなかった。一方、硝化抑制剤として米国で使用されているジシアンジアミドは N_2O 抑制には働かず、むしろ N_2O 放出を亢進した。それに対し、キガラシの代表的二次代謝産物であるアリルイソチオシアネートは $30\mu\text{M}$ の濃度でゲル培地中の N_2O 放出を完全に阻害したが、その効果はばらつきが大きく、キガラシ全草を混ぜ込むとむしろ N_2O 放出が促進された²³⁾。

これら一連の研究で、土壌中の硝酸呼吸細菌(脱窒細菌)の硝酸塩呼吸や一連の還元反応の阻害に、圃場に散布が許容される化学資材つまりは農薬の一部が有効であることが示された。これらをもとに、より効率よく N_2O 放出を抑制できる除草剤が開発され、より実用性の高い N_2O 抑制剤としての機能を併せ持つハイブリッド農薬の開発が加速することを期待している。

6. *Bacillus* 属細菌の抗生物質産生を高める オカラ抽出物の芽胞形成誘導物質の探索

グラム陽性細菌である *Bacillus* 属は、典型的な長桿状栄養増殖菌体を有し、偏性好気的に植物表面や土壌に棲息する、培養可能でありふれた真正細菌である。納豆製造に使用されており (*B. subtilis*)、また殺虫性微生物農薬資材に用いられるものがある (*B. thuringiensis*) など、我々日本人を含め人類全般との関わりが深い細菌群である。この長桿状栄養増殖菌体は、飢餓状態に陥ると耐久性をもつ短桿形の芽胞へと形態分化することが知られている。この芽胞に分化する際、*Bacillus* 属細菌の多くで環状リポペプチド系抗生物質の産生亢進や、昆虫特異的タンパク性毒素である Cry トキシンの大量産生など、特定の代謝亢進が連動することが知られている。

オカラには、これら *Bacillus* 属細菌栄養増殖菌体の芽胞化を誘導し、抗生物質産生量を大きく上昇させる活性の存在が古くから認められているが、その活性物質の単離精製は達成されていなかった。我々は、オカラ新鮮重 10kg を MeOH 抽出にかけ、これによって得た脱脂メタノール抽出物(水可溶部)に環状リポペプチド抗生物質産生亢進活性と対 *Bacillus*

属細菌芽胞誘導活性を見出したため、LIVE/DEAD BacLight 染色による簡便な芽胞判別と各種クロマトグラフィーで、その芽胞誘導活性本体を追跡した。その結果、*Bacillus* 属一般に対する芽胞形成誘導因子として、ジアセトナミン (4-amino-4-methyl-penten-2-one, 12) を単離した (Fig. 3b)。実際には、活性本体約 40mg を含む最終精製画分 450mg を得、その一部をアセチル化することで活性物質本体の単離精製とその構造解析に成功している²⁴⁾。

ジアセトナミンは、アセトン2分子のアルドール縮合で生成するメシチルオキシド (4-methyl-3-penten-2-one) にアンモニアがマイケル付加した水溶性低分子1級アミンである。そのため、この化合物がアーティファクトである可能性は排除できなかったが、アセトンとアンモニアを全く使用しないオカラ抽出物分画操作で得た活性画分にこの化合物が再現性良く含まれており、少なくとも単離精製途上で溶媒から生成した類のものではないことを確認している。

この化合物の N-アクリル酸とのアミド誘導体ジアセトンアクリルアミド(13)はポリウレタンの親水性改善のための共重合剤、あるいはポリマー形状安定化のための架橋剤としての用途があり、工業的製造法が確立されている。この化合物13には、*B. amyloliquefaciens* に対してジアセトナミン塩酸塩よりも強い芽胞形成誘導活性が見出されている。これらの芽胞形成誘導物質は、プロバイオティクス資材調製剤、あるいは芽胞形成に伴う抗生物質産生誘導剤としての用途が期待できる。

このオカラのケースも、観察から見出した現象を化学生態学的視点で解析し、芽胞形成物質を単離同定するとともに、農業や発酵生産上重要な微生物の代謝や分化を化学物質でピンポイント制御することの実効性を示した好例になると考えられる。

おわりに

天然物化学に関わっておよそ30年、日本農薬学会に参加するようになって10年が過ぎた。農薬学会に所属して感じたことは、応用へ繋がってゆくと確信できる生理活性因子研究の面白さである。現象の観察から見いだした生理活性物質や、汎用農薬資材、あるいは簡単な既知低分子化合物にこれまで知られていない生理活性を見いだすことは、過去の知識を有効に使って新たな地平線を眺望していることでもあるから、いわゆる“巨人の肩に立つ”だけのことかもしれない。しかしながら、それが問題解決(病虫害防除や温室効果ガス放出抑制)に繋がるものになれば、これは実学を目指す農学研究者冥利に尽きるというものである。我々の研究室で見いだした難防除植物病原菌制御物質や亜酸化窒素(N_2O)放出細菌などの制御薬剤は、「農薬」ではない(つまり殺菌剤ではない)対難防除薬剤としての可能性(対イネ苗立枯細菌病)や、圃場に抵抗なく散布できる農薬、特に電子伝達系阻

害タイプの除草剤のもつ二次的効能の可能性 (N_2O 放出抑制) を大きく広げたように思われる。加えて, *Bacillus* 属細菌などの芽胞形成誘導物質の発見からは, 微生物の形態分化や機能分化制御の観点で, さらなる展開が期待できそうである。

ここで紹介した研究は, 北海道大学大学院農学研究院で行われたものである。筆者が所属し, 研究の場と機会を与えてくださった水谷純也北大名誉教授, 科学の基礎と研究の面白さを教えてくださった田原哲士北大名誉教授, 研究とは対象の刷新とアイディア勝負であることを教授していただいた比留木忠治アルバータ州立大名誉教授にこの場を借り, 感謝申し上げたい。イネ苗立枯細菌病に対する拮抗微生物の研究を推進してくれた Wang Mengcen 博士 (現, 中国浙江大学講師) と根圏拮抗微生物の先駆的研究を行ってくれた Abhinandan Deora 博士 (現, Syngenta Canada) をはじめ, 本研究には多くの学生諸氏や共同研究者に関わっていただいたことを付記し, 謝意を示したい。

引用文献

- 1) J. B. Harborne, 高橋英一, 深海 浩 (訳): ハルボーン化学生態学, 文永堂, 1977.
- 2) 對馬誠也: 日植病報 80 特集号, 188–196 (2014).
- 3) R. Yasumura, K. D. Ashtekar, A. Tonouchi, T. Nehira, B. Borhan and M. Hashimoto: *Tetrahedron* **69**, 9469–9474 (2013).
- 4) Y. Hashidoko, H. Hayashi, T. Hasegawa, E. Purnomo, M. Osaki and S. Tahara: *Tropics* **15**, 391–395 (2006).
- 5) 橋床泰之, 工藤亮太, 井沢典彦: 日本農薬学会第 35 回大会講演要旨集, p. 119, 2010.
- 6) Y. Hashidoko, T. Hasegawa, E. Purnomo, M. Tada, S. H. Limin, M. Osaki and S. Tahara: *Tropics* **14**, 139–147 (2005).
- 7) 畔上耕児: 微生物遺伝資源利用マニュアル 26, 1994. ISSN 1344-1159.
- 8) Y. Hashidoko, R. Kudo, A. Takizawa, E. Purnomo and N. Izawa: *12th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. Abstract Paper*, p. 510, 2010.
- 9) M. Wang, M. Hashimoto and Y. Hashidoko: *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1906–1914 (2013).
- 10) M. Wang, S. Tachibana, Y. Murai, L. Li, S. Y. L. Lau, M. Cao, G. Zhu, M. Hashimoto and Y. Hashidoko: *Sci. Rep.* **6**, 22596 (2016).
- 11) V. Thiel, T. Brinkhoff, J. S. Dickschat, S. Wickel, J. Grunenberg, I. Wagner-Dobler, M. Simon and S. Schulz: *Org. Biomol. Chem.* **8**, 234–246 (2010).
- 12) Y. Murai, L. Wang, K. Masuda, Y. Sakihama, Y. Hashidoko, Y. Hatanaka and M. Hashimoto: *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 5111–5116 (2013).
- 13) Y. Hashidoko: *Phytochemistry* **43**, 535–549 (1996).
- 14) R. Yasumura, K. D. Ashtekar, A. Tonouchi, T. Nehira, B. Borhan and M. Hashimoto: *Tetrahedron* **69**, 9469–9474 (2013).
- 15) M. Wang, M. Hashimoto and Y. Hashidoko: *PLoS ONE* **8**, e78024 (2013).
- 16) S. Tahara: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1387–1404 (2007).
- 17) M. Wang, T. Takayama, D. Kim, Y. Sakihama, S. Tahara and Y. Hashidoko: *J. Pestic. Sci.* **38**, 181–187 (2013).
- 18) A. Deora, Y. Hashidoko, M. T. Islam and S. Tahara: *Eur. J. Plant Pathol.* **112**, 311–322 (2005).
- 19) E. Hatano, Y. Hashidoko, A. Deora, Y. Fukushima and S. Tahara: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1601–1605 (2007).
- 20) A. Deora, E. Hatano, S. Tahara and Y. Hashidoko: *Plant Pathol.* **59**, 84–99 (2010).
- 21) L. Melling, R. Hatano and K. J. Goh: *Tellus* **57B**, 1–11 (2005).
- 22) L. Li, M. Wang, R. Hatano and Y. Hashidoko: *J. Pestic. Sci.* **39**, 115–120 (2014).
- 23) T. Nishiyama, D. Haba and Y. Hashidoko: *Int. J. Environ. Agric. Res.* **2**, 71–77 (2016).
- 24) A. Ikeda, D. Kim and Y. Hashidoko: *AMB Express* **7**, 101 (2017).

略歴

橋床泰之 (はしどこ やすゆき)

生年月日: 1962 年 4 月 30 日

最終学歴: 1990 年 3 月, 北海道大学大学院農学研究院博士後期課程

研究テーマまたは主な職歴: (テーマ) 生物の環境応答と生物間相互作用の分子レベルでの解明, (主な職歴) 1990 年 4 月 ERATO 研究員, 1996 年 3 月, 北海道大学農学部助教授, 2007 年 4 月, 北海道大学大学院農学研究院教授

趣味: 果実溢れる庭造り, 自然の美しいものの面白いものの探索