イネ稲こうじ病粒のウスチロキシン A の含有量における菌株間の差異

高橋 真実^{1*}・芦澤 武人¹・山中 典子²・荒井 治喜¹・高橋 美幸²

ABSTRACT

TAKAHASHI, M.^{1*}, ASHIZAWA, T.¹, YAMANAKA, N.², ARAI, M.¹ and TAKAHASHI, Y.² (2012) Pathogenic isolates of *Ustilaginoidea virens* differ greatly in their production of ustiloxin A in rice false smut balls. Jpn. J. Phytopathol. 78: 305–308.

A protocol to quantify ustiloxin A (ustA) in a bulk sample of false smut balls of rice (J. Vet. Med. Sci. 71: 239–241) was modified to quantify ustA in single balls collected from a paddy field after natural infection and in balls formed after rice plants were inoculated with either of two isolates of *Ustilaginoidea virens* isolated from different commercial fields in Fukui Prefecture. To test whether these isolates differed in their capacity to produce ustA, we compared the mean quantity of ustA that each produced in individual balls. The two isolates varied greatly in ustA production; the differences in ustA in balls between the two ranged from 42-fold to 115-fold. Such massive differences in ustA production indicate that the pathogenic isolate is an important contributing factor to the quantity of ustA produced in false smut balls.

(Received February 17, 2012; Accepted May 2, 2012)

Key words: rice, rice false smut, quantitative detection, ustiloxin A, mycotoxin

イネ稲こうじ病菌 [*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi, teleomorph: *Villosiclava virens* E. Tanaka & C. Tanaka] (Tanaka *et al.*, 2008) の感染により穂に形成される病粒には、ウスチロキシン A が含まれる。ウスチロキシン A は、微小管タンパク質の重合の阻害作用、培養細胞への毒性が明らかになっており、マウスへの投与実験により肝臓、腎臓、前胃に障害を起こすことが確認されている (Koiso *et al.*, 1992; Koiso *et al.*, 1994; 仲村ら, 1992)。このようには乳類に対して毒性を示すことから、食用米や飼料米の汚染による人や家畜への影響が懸念されている。安全性を確保するために、病原菌のウスチロキシン A の産生や蓄積に関する研究を進める必要がある。そのためには、適切な定量法が必要である。

これまでに家畜の飼料用のサイレージ 5 g や病粒 24 g, 110 g からウスチロキシン A を抽出して定量がおこなわれた (Koiso *et al.*, 1994; Miyazaki *et al.*, 2009)。しかし、病原菌の毒素産生の解析においては、さらに少量のサンプルから定量する方法が求められる。

稲こうじ病菌は、開花前の穎花に侵入して病粒を形成する

が (芦澤・片岡, 2005; 池上, 1959; 園田, 1996)、感染過程の詳細は明らかではない。藤田ら (1989) は、接種試験の結果から、出穂前の特定の発達過程の穎花が感染し易いと考察している。感染した穎花では、菌が内部で充満して膨らみ、外穎と内穎の間から露出して、暗緑色の厚壁胞子に覆われた病粒となる (園田, 1996)。池上 (1959) は、複数個の病粒が存在する穂を観察して、病粒の存在位置から、同一穂に存在する病粒は、共通の感染源から派生する 경우가多いと考察している。穎花は比較的に閉鎖的な環境であり、病原菌が穎花の中に次々と侵入するとは考えにくい。さらに、感染した穎花ごとに病粒を形成していくので、個々の病粒を定量的単位とすれば、由来の異なる複数の病原菌の産生毒素を量る可能性は低くなると考えられる。また、病粒は、採集が簡単で扱い易い。これらの理由から、個々の病粒を定量的対象とすることは、菌株の毒素産生能力の評価や経時的な蓄積量の評価等に適していると考えられる。また、圃場で発生した病粒数を知ることが可能なので、病粒当たりの含有量から毒素量を推定する等の利用も期待できる。我々は、1 病粒中のウスチ

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター北陸研究センター (〒 943-0193 新潟県上越市稲田 1-2-1) Hokuriku Research Center, NARO Agricultural Research Center, 1-2-1 Inada, Joetsu, Niigata 943-0193, Japan

² 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5) NARO Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

* Corresponding author (E-mail: mamitaka@affrc.go.jp)

ロキシシン A の定量法を検討した。さらに、稲こうじ病菌株及び宿主であるイネ品種がウスチロキシシン A 産生に及ぼす影響を解析した。

1 病粒中のウスチロキシシン A の定量 24 g の病粒からウスチロキシシン A を定量した Miyazaki *et al.* (2009) による方法を、1 病粒 (約 30 ~ 200 mg) の定量が可能となるように改変し、新潟県上越市の稲こうじ病が常発する圃場で 2011 年に栽培された「コシヒカリ」から 6 病粒、「夢あおば」から 6 病粒を採集して、1 病粒中のウスチロキシシン A の定量を試みた。病粒は、一週間風乾後、定量した。1 病粒を、ジリコニアシリカビーズ (0.6 mm) 0.5 g とステンレスビーズ (6 mm) 1 個と共に 2 ml 容量のチューブに入れ、1 ml の蒸留水を加えた。これをあらかじめ -20°C に冷却したチューブホルダーにセットし、1000 rpm で 3 分間破碎処理した (シェイクマスターオート, (株) バイオメディカルサイエンス)。蒸留水を加えてから破碎処理したのは、温度上昇を抑制する効果を期待したからである。破碎処理後に 30 分間振とうして (キュートミキサー CM-1000, 東京理化)、ウスチロキシシン A を抽出した。これを 15,000 rpm で 15 分間遠心分離して、上清を回収した。沈殿には 1 ml の蒸留水を加えて、再度、破碎処理、振とう、遠心分離を繰り返して、合わせて 2 ml の抽出液を得た。

続いて、抽出液 1 ml を Sep-Pak® Plus C18 cartridge (充填量 360 mg 日本ウォーターズ) で処理した。カラムは、メタノール 5 ml、水 5 ml を通した後、サンプル 1 ml を加えて保持させて、5 ml の水で 3 回洗浄した後、5 ml の 20% エタノール (v/v) で抽出した。このサンプル 20 µl について高速液体クロマトグラフィー (LC-10Ai 島津製作所) を行い、ウスチロキシシン A のピークを同定した。カラムは、Wakocil-II

5C18 RS (250 mm × 4.6 mm Wako) を用い、移動相は、水、メタノール、リン酸 [400 : 100 : 1 (v)] とし、0.5 ml/分の流速で分離した。動物衛生研究所が東京大学より分譲を受けたウスチロキシシン A の標品で定量したウスチロキシシン A 粗抽出物をワーキングスタンダードとし (Miyazaki *et al.*, 2009)、分析値を比較して病粒の抽出液の濃度を求めた。供試した 12 病粒すべてで、ウスチロキシシン A のピークが認められ、定量可能であった。個々の病粒のウスチロキシシン A の含有量を第 1 表に示した。病粒当たりの含有量の平均値 (標準偏差) は、「コシヒカリ」に形成された病粒では、24.3 µg (19.8), 「夢あおば」では 22.1 µg (26.0) であった。病粒 1 g 当たりの含有量の平均値は、「コシヒカリ」の病粒では 334.3 µg (182.0), 「夢あおば」では 159.2 µg (104.6) であった。

あらかじめ既知の量のウスチロキシシン A を加えたサンプルについて、前述の方法で定量し、回収率を調べた。夢あおばの病粒 2 個を乳鉢で軽く磨砕し、よく混ぜて均一とした後に二分して (各 22 mg)、その片方に、1.58 µg のウスチロキシシン A を含む粗抽出物を加えた。これらを定量した結果、各サンプルのウスチロキシシン A 量は、4.58 µg 及び 3.36 µg であった。2 サンプルの差は 1.22 µg であり、添加した 77.2% のウスチロキシシン A が回収されたと考えられた。

以上のように、本研究で検討した方法により、圃場で自然発生した 12 病粒すべてについて定量することができた。1 病粒のようにサンプルが少量であれば、破碎処理時に容器に付着して回収できないサンプル量の割合が多くなるために、正確な測定が困難となる。しかし、本法は、ビーズ式破碎機を使用して、1 つのチューブ内で破碎から抽出までを行うことから、測定が可能であったと考えられる。

病粒の毒素含有量の菌株及び宿主品種による差 菌株及

第 1 表 上越市の圃場で採集された病粒のウスチロキシシン A の含有量

宿主品種	サンプル番号	病粒の重量 (mg)	1 粒当たりの含有量 (µg)	1 g 当たりの含有量 (µg)
コシヒカリ	1	32.2	7.3	227.5
	2	43.3	7.7	177.9
	3	53.4	14.7	275.2
	4	76.7	47.8	623.2
	5	102.4	50.9	496.5
	6	84.5	17.4	205.8
	平均	65.4	24.3	334.3
夢あおば	1	46.9	5.8	123.5
	2	62.7	5.0	79.8
	3	90.8	9.8	107.8
	4	129.5	25.9	200.3
	5	146.4	13.1	89.7
	6	206.0	72.9	354.1
	平均	113.7	22.1	159.2

第2表 稲こうじ病菌株 (U2006-8 及び U2006-9) の接種により, 「コシヒカリ」, 「夢あおば」に形成された病粒のウスチロキシンの含有量

菌株名	コシヒカリ				夢あおば			
	1粒当たり		1g 当たり		1粒当たり		1g 当たり	
	含有量 (μg)	標準偏差	含有量 (μg)	標準偏差	含有量 (μg)	標準偏差	含有量 (μg)	標準偏差
U2006-8	1.6	0.8	22.9	10.0	2.9	1.4	35.0	8.8
U2006-9	116.7	25.6	1539.1	591.6	51.6	17.1	1117.3	449.4

第3表 稲こうじ病菌株 (U2006-8 及び U2006-9) の接種により, 「あきたこまち」, 「ホシアオバ」に形成された病粒のウスチロキシンの含有量

菌株名	あきたこまち		ホシアオバ	
	1粒当たり含有量 (μg)	1g 当たり含有量 (μg)	1粒当たり含有量 (μg)	1g 当たり含有量 (μg)
U2006-8	1.8	24.3	1.2	14.7
U2006-9	115.0	1347.1	90.2	1691.8

びイネ品種の違いが毒素産生に及ぼす影響を解析するために, Ashizawa *et al.* (2011) の方法に従った人工接種により, 温室内で形成された病粒について, 前述の方法で定量した. 「コシヒカリ」, 「夢あおば」の2品種に稲こうじ病菌2株 (U2006-8, U2006-9) の分生子をそれぞれ接種した. いずれの供試菌株も, 2006年に一般圃場で発生した病粒から分離したものであり, U2006-8は, 福井県吉田郡永平寺町で, U2006-9は, 福井県福井市大宮町で採取された. これらの菌株は, ジャガイモ煎汁寒天培地上の菌の増殖速度に差が見られず, イネに接種した時の病徴や病粒形成数にも特段の違いは認められなかった. 接種は, 2010年7月8日 (「夢あおば」) と7月17日 (「コシヒカリ」) に行い, 病粒は出穂20日後に採集した (「夢あおば」8月11日, 「コシヒカリ」8月17日). 病粒は, 皮膜が破れて, 暗緑色であった. 病粒は, 風乾後4°Cで保存した. 接種したイネ品種と菌株が共通する実験ごとに, 3病粒あるいは5病粒のウスチロキシンの量を定量した.

定量の結果を第2表に示す. 各病粒の定量結果を1g当りに換算して, 菌株及び品種の含有量に対する影響を共分散分析 (統計解析ソフトウェア R ver. 2.13.0) で評価した. その結果, 菌株と品種の交互作用は, 有意ではなかった ($P = 0.2589$). さらに, 交互作用がないとして品種と菌株の効果を調べた. その結果, 品種による効果は有意でなかった ($P = 0.2905$) が, 菌株による効果は有意であった ($P = 1.058 \times 10^{-5}$). 2品種の U2006-9 による病粒の定量値 (1g 当たりのウスチロキシンの含有量) から求めた平均値は, U2006-8 による病粒の平均値と比較して 42 倍であった.

U2006-8 と U2006-9 のウスチロキシンの産生量の差異を確認するために, 「あきたこまち」と「ホシアオバ」にも接

種を行い, 形成された病粒について定量した. 接種及び病粒形成は, 「コシヒカリ」と「夢あおば」の場合と同様な方法でおこなった. 3病粒を合わせて定量し, 病粒1粒当たりと病粒1g当たりの含有量を求めた (第3表). 「コシヒカリ」と「夢あおば」の接種試験と同様に, 「あきたこまち」と「ホシアオバ」の場合も品種間では含有量に大きな差が認められなかった. しかし, U2006-9の病粒の1g当たりの含有量は, U2006-8の病粒と比較して, 「あきたこまち」では55倍, 「ホシアオバ」では115倍であった.

感染初期のウスチロキシンの蓄積について知見を得るために, U2006-8 及び U2006-9 を「あきたこまち」, 「ホシアオバ」にそれぞれ接種し, 出穂後3日から5日経過した穎花についても定量を試みた. 穎花は, 実体顕微鏡で観察すると, 外穎と内穎がわずかに開き, 白みがかかったオレンジ色の稲こうじ病の菌体が認められた. 穎花は, 3個あわせて定量した. U2006-8に感染した「あきたこまち」の穎花では1.1 μg, 「ホシアオバ」では2.1 μg, U2006-9に感染した「あきたこまち」では60.0 μg, 「ホシアオバ」では88.1 μgのウスチロキシンの量が検出された. このように, 病粒形成の初期であってもすでにウスチロキシンの生成されていることが明らかになった. この結果から, 稲こうじ病が常発する圃場では, 目視によって病粒が確認できない早期に収穫した飼料にも, ウスチロキシンの含有量がある可能性があると考えられた.

「コシヒカリ」, 「夢あおば」の接種試験により, ウスチロキシンの含有量に対して菌株の違いが有意であることが示され, 「あきたこまち」, 「ホシアオバ」での接種試験でも菌株間で明瞭な差が認められた. どの試験においても菌株間の含有量の差は大きく, 42倍以上であった. この結果から, 菌株が

ウスチロキシンAの産生量に大きく影響する因子であることが明らかである。また、自然発生圃場から採取された病粒間でも1粒当たりの含有量で15倍、1g当たりの含有量で8倍の差異が検出された(第1表)。以上より、生産物のウスチロキシンAの汚染程度を予測するには、収穫物がどのような毒素産生能力を持つ菌によって汚染されたのかを評価することが重要であり、病粒あるいは収穫物の一部について毒素含有量を測定することが不可欠であると考えられた。

今後、本研究で示したように、病粒形成法(Ashizawa *et al.*, 2011)と1病粒中のウスチロキシンAの定量法を組み合わせた解析を行なうことにより、稲こうじ病菌の毒素産生に係る生理学的研究の進展が期待できる。

本研究を実施するにあたり、動物衛生研究所の宮崎茂氏、吉岡都氏、嶋田伸明氏に分析に関する助言及び指導を賜った。中央総合農業研究センター北陸研究センターの高橋明彦氏には、統計解析の指導を賜った。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

芦澤武人・片岡由希子(2005). イネ稲こうじ病菌特異的プライマーを用いたNested-PCRによる圃場に栽培された出穂前後の穂からの検出. 日植病報 71: 16–19.

Ashizawa, T., Takahashi, M., Moriawaki, J. and Hirayae, K. (2011). A refined inoculation method to evaluate false smut resistance in rice. J. Gen. Plant Pathol. 77: 10–16.

藤田佳克・園田亮一・八重樫博志(1989). 稲こうじ病菌分生胞子のイネ穂ばらみ期接種. 日植病報 55: 629–634.

池上八郎(1959). 稲麴病に関する研究 III. 穂における病粒の発生と被害解析. 岐阜大農研報 11: 56–63.

Koiso, Y., Natori, M., Iwasaki, S., Sato, S., Sonoda, R., Fujita, Y., Yaegashi, H. and Sato, Z. (1992). Ustiloxin: A phytotoxin and a mycotoxin from false smut balls on rice panicles. Tetrahedron Lett. 33: 4157–4160.

Koiso, Y., Li, Y., Iwasaki, S., Hanaoka, K., Kobayashi, T., Sonoda, R., Fujita, Y., Yaegashi, H. and Sato, Z. (1994). Ustiloxins, antimicrobial cyclic peptides from false smut balls on rice panicles caused by *Ustilaginoidea virens*. J. Antibiot. 47: 765–773.

仲村賢一・泉山七生貴・大坪浩一郎・小磯邦子・岩崎成夫・園田亮一・藤田佳克・八重樫博志・佐藤善司(1992). *Ustilaginoidea* 産生トキシンの phomopsin A の類似作用—マウスによる急性毒性実験—. マイコトキシン 35: 41–43.

Miyazaki, S., Matsumoto, Y., Uchihara, T. and Morimoto, K. (2009). High-performance liquid chromatographic determination of ustiloxin A in forage rice silage. J. Vet. Med. Sci. 71: 239–241.

園田亮一(1996). 稲こうじ病の発生生態と防除法. 植物防疫 50: 351–354.

Tanaka, E., Ashizawa, T., Sonoda, R. and Tanaka, C. (2008). *Villosiclava virens* gen. nov., comb. nov., teleomorph of *Ustilaginoidea virens*, the causal agent of rice false smut. Mycotaxon 106: 491–501.