イネもみ枯細菌病菌の産生する毒素*

佐藤 善司**・小磯 邦子***・岩崎 成夫***・松田 泉**・白田 昭****

Zenji SATO**, Yukiko KOISO***, Shigeo IWASAKI***, Izumi MATSUDA**,
Akira SHIRATA****: Toxins Produced by *Pseudomonas glumae*

Abstract

Two compounds which were identified as fervenulin and toxoflavin were isolated as toxins produced by *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice. These toxins produced a chlorotic spot on leaves of rice seedlings at a concentration of about 10 µg/ml or more. It was also observed that the growth of leaves and roots of rice seedlings was reduced when they were treated with these toxins.

Key words: fervenulin, toxoflavin, toxin, *Pseudomonas glumae*, rice.

イネもみ枯細菌病菌 *Pseudomonas glumae* がイネ葉に白色壊死斑、ナンなどの植物葉に褐色壊死斑を形成する毒性物質を産生することはすでに報告した¹⁾。その後、本病の特徴的な病徴の一つであるイネ葉および籾の白化症状に着目し、白色壊死斑を形成する毒素活性を指標として、さらに本病原細菌の産生する毒素の検索・分離を試みた。

毒素活性の検定 毒素活性の検定には3葉期のイネ(品種:愛知旭)を用いた。すなわち、第3葉(最上展開葉)をその中央から先端方向に約2 cmの長さに切り離し、切離葉の中央部に木綿針(1針)で軽く付傷して、50%メタノールに溶解または懸濁した被験液5 µlをマイクロピペットで滴下した。処理葉をベトリ皿湿室に静置して25°C、蛍光灯照明下に48時間保持したのち、白色壊死斑形成の有無を指標として毒素活性を検定した。

毒素の分離・精製 当研究室保存のPg-1菌株を供試し、キングB培地で38°C、24~48時間振盪培養

後、10,000×g、15分間遠心分離して除菌した。上清200 mlを合成吸着剤HP 20(三菱化成社製)に吸着させ、水、水-メタノール(1:1, v/v)、メタノール各500 mlで順次溶出した。水画分にはイネ葉に褐色壊死斑を形成する酸性物質が多量に溶出され、その主成分はシュウ酸と同定された。水-メタノール画分には淡緑黄色の色素が溶出され、白色壊死斑を形成する強い毒素活性が認められた。この画分を濃縮して得た737.3 mgの固体を水に溶解し、クロロホルムで抽出した。さらに、メチレンクロリド-メタノール(98:2)を溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返して抽出物を分離・精製し、シリカゲル薄層上、メチレンクロリド-メタノール(9:1)でR_f 0.75, 0.39, 0.32に展開される化合物(1), (2), (3)をそれぞれ1.1, 12.7, 12.8 mg得た。

化学構造の決定 各種スペクトルにより、これらの化合物はすでに報告されているつぎの3化合物と同定された(第1図)。

* 本報告の概要は昭和63年度日本植物病理学会大会で発表した。

** 農林水産省農業環境技術研究所 National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

*** 東京大学応用微生物研究所 Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

**** 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

1) 白田 昭・畔上耕児・本蔵良三・松田 泉・佐藤善司(1986)。日植病報 52: 92-93 (講要)。

第1図 毒素の化学構造。

Fervenuin (1)^{2,3)}; mp. 168~170 C (EtOH). UV. $\lambda_{\max}$ (MeOH) 237, 339 nm. IR (KBr) 1725, 1625, 1575, 1535 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.58 (3H, s, N(6)-Me), 3.92 (3H, s, N(8)-Me), 9.84 (1H, s, H(3)).

Toxoflavin (2)⁴⁻⁶⁾; mp. 166~168 C (EtOH). UV. $\lambda_{\max}$ (MeOH) 246, 380 nm. IR (KBr) 1700, 1660, 1610, 1530 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.51 (3H, s, N(6)-Me), 4.16 (3H, s, N(1)-Me), 8.81 (1H, s, H(3)).

Reumycin (3)⁷⁾; mp. 242~244 C (EtOH). UV. $\lambda_{\max}$ (MeOH) 236, 335 nm. IR (KBr) 1735, 1685, 1585 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.54 (3H, s, N(6)-Me), 9.86 (1H, s, H(3)).

これらの化合物について、さらに構造確認および毒素活性検定のため、既報の方法^{8,9)}によりまず toxoflavin を合成し、ついでこれを reumycin, fervenuin に変換¹⁰⁾して、本病原細菌培養液から得た化合物と比較同定した。

Toxoflavin は比較的不安定であり、種々の条件下で容易にN(1)-Me が離脱して reumycin に変化する。そこで、分離・抽出等の操作をせずに、24, 40, 68 時間培養した本病原細菌の培養液を直接、高速液体クロマトグラフィー (Senshu Pak ODS-H-4201, 10 ϕ × 200 mm) で分析した結果、24 時間培養後に toxoflavin は約 12 mg/100 ml 産生され、40 時間でもほぼ同量であるが、68 時間では約半量に減少した。Fervenuin の産生量は 24~68 時間の範囲で 1 mg 以下であった。

しかし、reumycin の産生はまったく認められなかった。また、培養液を HP20 カラムで処理すると reumycin の生成が認められた。したがって、reumycin は本病原細菌によって産生されるのではなく、分離操作の過程で生成するものと結論した。

本病原細菌は蛍光性色素を産生しないと報告されて

第2図 毒素の薄層クロマトグラム。プレート：シリカゲル 60 (メルク社製)、展開溶媒：メチレンクロリド-メタノール (9:1, v/v)、展開距離：10 cm、検出方法：近紫外線 (366 nm) 照射、F: fervenuin (R_f 0.75), T: toxoflavin (0.39), R: reumycin (0.32)。いずれの化合物も淡緑黄色の蛍光を発する。

- 2) DeBoer, C., Deitz, A., Evans, J.S. and Michaels, R.M. (1959-1960). Antibiot. Ann. 220-226. 3) 田辺一雄・朝日 豊・西川正夫・島 高・桑田 胖・神沢得之助・緒方浩一 (1963). 武田研究所年報 22: 133-139. 4) Daves, G.D., Robins, R.K. and Cheng, C.C. (1961). J. Am. Chem. Soc. 83: 3904-3905. 5) Hellendoorn, A.S., Cate-Dhont, R.M.T. and Peerdeman, A.F. (1961). Rec. Trav. Chim. 80: 307-308. 6) Machlowitz, R.A., Fisher, W.P., McKay, B.S., Tytell, A.A. and Charney, J. (1954). Antibiot. Chemoth. 4: 259-261. 7) Navashin, S.M., Fomina, I.P., Koroleva, V.G., Terentieva, T.G. and Stegelman, L.A. (1967). Antibiotiki 12: 892-898. 8) Daves, G.D., Robins, R.K. and Cheng, C.C. (1962). J. Am. Chem. Soc. 84: 1724-1729. 9) Yoneda, F., Shinomura, K. and Nishigaki, S. (1971). Tetrahedron Lett. 851-854. 10) Yoneda, F., Nagamatsu, T. (1973). Ibid. 1577-1580.

いるが¹¹⁾、これらの化合物はいずれも近紫外線 (366 nm) 照射下で鮮明な淡緑黄色の蛍光を発する (第 2 図)。

白色壊死斑形成作用 前述の毒素活性検定方法に従って、培養液から分離した 3 化合物のイネ葉における白色壊死斑形成作用について検討した。その結果、toxoflavin の活性が最も強く (第 3 図)、白色壊死斑形成最低濃度は $6.3 \mu\text{g/ml}$ であり、fervenulin のそれは $12.5 \mu\text{g/ml}$ 、reumycin の活性は弱く、 $50 \mu\text{g/ml}$ であった。なお、合成物の活性もまったく同様であった。いずれの化合物も白色壊死斑を形成するためには光が必要であり、暗黒条件下では明瞭な白色壊死斑は形成されなかった。

イネ幼苗生育阻害作用 芽長 1 mm 程度に催芽させた種子 (品種：愛知旭) をアクリル樹脂製の種子保持器に挟み、各供試化合物の水溶液 2 ml を入れたガラス瓶 ($3 \phi \times 6 \text{ cm}$) に静置して、上部をアルミ箔で覆った。25 C, 12 時間照明-12 時間暗黒条件下に 4 日間保持したのち、第 2 葉 (葉身+葉鞘) 長を測定して生育阻害率を求めた。その結果 (第 4 図)、3 化合物とも葉の伸長阻害作用は大差なく、 $40 \mu\text{g/ml}$ の濃度で約 30~35% の阻害率を示した。根の伸長阻害作用は fervenulin と reumycin が強く、 $40 \mu\text{g/ml}$ の濃度でそれぞれ約 86 および 88% の阻害率を示したが、toxoflavin の阻害率は低く、約 17% であった。伸長阻害のほか、いずれの化合物も高濃度では葉緑素の生成を阻害し、

第 3 図 毒素によって形成された白色壊死斑。イネ品種：愛知旭，葉位：第 3 葉，各毒素濃度： $100 \mu\text{g/ml}$ ，滴下液量： $5 \mu\text{l}$ ，湿室，25 C，蛍光灯照明下，48 時間後。F: fervenulin, T: toxoflavin, R: reumycin, C: 対照。

イネ苗全体が白化する症状が現れた。

以上のように、本病原細菌の産生する毒素として、既知の fervenulin および toxoflavin を分離・同定できた。Fervenulin は *Streptomyces fervens* の産生する抗生物質として最初に報告されたが²⁾、ほとんど同時に発表された *Streptomyces rubrircetuli* の産生する抗生物質 planomycin は fervenulin と同一物質であることが判明した³⁾。Toxoflavin はインドネシア (中部ジャワ) で発生した食中毒の原因菌である *Pseudomonas cocovenenans* の産生する毒素として最初に報告されたが^{12,13)}、その後 *Streptomyces* 属菌の産生する抗生物

第 4 図 毒素のイネ幼苗生育阻害作用。イネ品種：愛知旭，25 C，12 時間照明-12 時間暗黒下。処理 4 日後に第 2 葉 (葉身+葉鞘) 長および根長を測定し、対照のそれらに対する百分率で表示。

11) 富永時任 (1971). 農技研報 C25: 189-306. 12) van Veen, A.G. and Mertens, W.K. (1934). Rec. Trav. Chim. 53: 257-266. 13) van Veen, A.G. and Mertens, W. K. (1934). Ibid. 53: 398-404.

質 xanthothricin は toxoflavin と同一物質であることが明らかになった⁸⁾。Toxoflavin はきわめて有効な電子伝達体であり、酸素の存在下で過酸化水素を発生して強い生物活性を示すことが報告されている¹⁴⁾。

Fervenulin および toxoflavin 両抗生物質が、本病原

細菌によって毒素として同時に産生されることは興味深い。これらの毒素が本病の病徴発現に関与している可能性を解明することは今後の研究課題である。

(昭和63年12月20日受理)

14) Latuasan, H.E. and Berends, W. (1961). Biochem. Biophys. Acta 52: 502-508.