マツの枯損に関与する糸状菌類に関する研究 (第4報)

諸岡 信久*, 角田 広*, 辰野 高司*

N. MOROOKA, H. TSUNODA, T. TATSUNO*: Studies on the fungi concerning the mortality of the pine tree.

既報^{1),2)}のごとく著者らは *Ceratocystis densiflora* nov. sp. が全国の立ち枯れたマツに共通に分布し、しかも本菌がアカマツ苗木にきわめて強い病原性を示すことを見出した。

現在までのところ「マツの立ち枯れ病」はマツノザイセンチュウが樹脂道に侵入し樹脂流出に異常が生じ、その結果「水ストレス」で立ち枯れる「萎凋病」であるとするのが定説とされている。しかしマツノザイセンチュウは「菌食性線虫」であり健全なマツの組織では増殖出来ないことを考えたとき、まず糸状菌類が材内で増殖する必要がある訳で、*C. densiflora* のような「マツの立ち枯れ病」に関してコッホの四原則を満足した糸状菌の研究は、今日のマツ枯れの原因解明とマツ林の保護に決定的な役割を果たすと考えた。

さて、*C. densiflora* で枯死したアカマツ苗木を検討したところ、その菌蓋の接種部位全体に松脂が浸出していたが、その中央に菌糸の侵入口が認められた。外皮の内側と韌皮部は溶解し穴があいており、菌糸がこの穴を通して材内に侵入したことを伺わせた。しかし、この付近から上方の木質部には透明感をもたせるまで松脂が充満し、菌糸は松脂の密度の低い下方へ伸長し、そこから心材に向けて樹脂道を経て仮道管に分布していた。

このように *C. densiflora* はマツにとって防御機構である松脂の抵抗を受けながらも樹脂道に侵入していることから考えて、その周辺細胞などに毒性代謝産物を分泌している可能性が示唆された。そこで著者らはマツの培養細胞に対して毒性を示す同菌の代謝産物の探索を行なうこととした。

実験材料および方法

1. *C. densiflora* の培養方法: 培養液 1 l の組成は Czapek (KCl: 0.5 g, MgSO₄: 0.5 g, K₂HPO₄: 1.0 g, NaNO₃: 2.0 g), Yeast 抽出物 2.5 g, ペプトン 5.0 g, ショ糖 5.0 g, Avicel (セルロース粉末) 10.0 g であった。この培養液に abietic acid 1.0 g, terebinth oil 1.0 ml, geraniol 1.0 ml など添加して菌蓋の成育、代謝産物の変化も検討した。培養条件は 15~25°C の室温に静置し、培養液が pH 7~8 を示すまでの 25~30 日間培養した。

2. 生物試験方法: 既報³⁾のごとくアカマツ新梢より分離した培養細胞(カルス)を用いた細胞毒性試験を行なった。この方法の特徴は供試液の影響をうけたカルスの生死の判別を重量法によらずに下記のごとく定量化出来ることである。無色透明の fluorescein diacetate を基質に選び、これにカルスに由来するエステラーゼを作用させた生成してくる化合物 fluorescein が黄緑色で 493.5 nm に最大吸収を示すため、この波長の吸光度を測定し検量線によってカルスの生存率を求めた。すなわち、カルスの死滅度が吸光度の低下として測定される (FDA 法)。

3. 分画方法: *C. densiflora* 培養液より、細胞毒性成分を活性炭に吸着させた後メタノールで脱着した。得られた含水メタノール分画は 40°C で減圧下メタノールを溜去し、残った水溶液は 5% 希硫酸で pH 3 に調整して酢酸エチルで抽出した。これを粗毒としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて、クロロホルム/メタノール (10:1) の混合溶媒でさらに細胞毒性成分の分離精製を行なった。

結果と考察

C. densiflora の生育に伴う菌蓋、培養液の性状の

* 理化学研究所 (〒351 埼玉県和光市広沢 2-1)
The Institute of Physical and Chemical Research
(Hirotsawa, Wako-shi, Saitama 351)

Fig. 1. Time course of pH, weight of the acidic substance from the culture filtrate and dry weight of the mycelium of *C. densiflora*. ●: acidic substance, ○: mycelium, □: pH.

変化は図1に示した。各数値は培養液 300 ml に対するものである。菌蓋重量は乾物で7日後 1.5 g, 14日後 2.5 g, 21日後 3.5 g と増加したが28日後 4 g と増加率が鈍った。培養液は漸次褐変度が増加した。液性は調製時 pH 7.2 であったものが, 7日後 5.7, 14日後 4.7, 21日後 4.9, 28日後 7.5 と一度下降したものの再び上昇し培養液によっては pH 8を示した。また濾液に含まれる酸性物質の変化は, 10日後 17 mg, 14日後 40 mg, 21日後 47 mg, 28日後 47 mg であった。本報では培養液の酸性分画重量が一定となり, pH 8 付近に液性が上昇した 28 日頃の代謝産物について検討した。まず培養液は前述のごとく分離精製を行ない, 各分画について 1000 ppm の濃度でアカマツカルスを用いた FDA 試験を行なったところ, 図2に示した結果を得た。図中の [アルファベット] は毒性の表示で [A] は FDA 試験で 0~25% の生細胞しか検出出来ず植継いでも増殖することなく枯死した。[B] は 26~50% で増殖は一部のコロニーに限られた。[C] は 51~75% で一部は枯死した。[D] は 76~100% でおおよそコントロールと同程度と判断出来た。[E] は101%以上でコントロールより増殖のよい果結を与えた。すなわち, 酢酸エチル抽出分画が [B] を示したのでこれを粗毒とした。この粗毒を前述のご

Fig. 2. Isolation of the culture filtrate of *Ceratocystis densiflora* and cytotoxicity of the each fraction.

[]: living pine callus (%) detected by the FDA test, A=0-25%, B=26-50%, C=51-75%, D=76-100% (control), E=101- %.

とく分画したところ分画4に毒性の中心が示された。この分画はベンゼンにより針状結晶化し Cd-1 と仮称した。

Cd-1 はヘキサン酢酸エチル (3:1) により再結晶したところ無色透明の板状結晶を与えた。mp. 194-199°C (分解); $M^+348.194$, $C_{20}H_{28}O_6$; 分子量は FD-mass, mili-mass の測定結果であり, Cd-1 はジテルペン系の化合物と推定された。 *C. densiflora* が Cd-1 を生産するのに abietic acid など松脂の成分は必須としなかった。Terebinth oil を添加すると菌蓋の生育は不良となった。Geraniol を添加すると静菌作用が観察された。従って Cd-1 は *C. densiflora* によって生合成され, その生産量は約 100 mg/10 l であった。

引用文献

- 1) 角田 広, 諸岡信久, 辰野高司: マイコトキシン, 12, 36 (1980).
- 2) 角田 広, 諸岡信久, 辰野高司: マイコトキシン, 14, 32 (1982).
- 3) 諸岡信久, 角田 広, 辰野高司: マイコトキシン, 14, 29 (1982).