マツノザイセンチュウの培養に用いる *Botrytis cinerea* の生産物 abscisic acid の単離とマツに対する毒作用

諸岡 信久^{*1}, 角田 廣^{*2}, 辰野 高司^{*3}

N. MOROOKO^{*1}, H. TSUNODA^{*2}, T. TATSUNO^{*3}: Isolation of abscisic acid from *Botrytis cinerea*, a fungus using cultivation of *Bursaphelenchus xylophilus*, and its toxic effects to pine tree

Summary

In Japan, epidemic occurrence of a destructive blight of pine trees has been reported as very serious problems on forest pathology. In the course of pathological studies on the causal agent, it was found that cut branch of Japanese red pine was wilted with culture filtrate of *Botrytis cinerea* isolated from the pine tree. This fungus was frequently used for cultivation of a pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, because the nematode is mycophagous. The phytotoxicity of culture filtrate was proven by a cytotoxic test using pine tissue culture, and abscisic acid and unidentified cytotoxic compounds were chemically isolated from the toxic fraction. The lethal effect of abscisic acid to the cultured pine cells was not observed at the level below 500 ppm, but the growth inhibition occurred above 125 ppm. Although the wilting effect of abscisic acid to seedlings of the Japanese red pine was not confirmed, their water consumption was strongly inhibited.

マツノザイセンチュウ *Bursaphelenchus xylophilus* (以下、材線虫と略す) がマツの激害型枯損の病原虫として報告されている¹⁾。しかし、マツ枯れと材線虫との関連を知る接種試験には、1) 地生えのマツに対してはマツノマダラカミキリから分離した耐久型幼虫 (種々の細菌、糸状菌が混在している)^{2), 3)}, 2) 芽出しなどを用いた生理実験には特定の糸状菌 (*Pestalotia* sp., *Botrytis cinerea*) で培養した材線虫

が用いられている^{1), 4)}。すなわち、菌食性の材線虫を用いた接種試験には糸状菌、細菌などを共存させてい

Fig. 1. *Botrytis cinerea*

^{*1} 東京理科大学薬学部 (〒162 東京都新宿区市谷船河原町12)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo (12, Ichigaya Funagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 162)

^{*2} 東京農業大学 (〒156 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

Tokyo University of Agriculture (1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156)

^{*3} 東京理科大学理学部 (〒162 東京都新宿区神楽坂1-3)

Faculty of Sciences, Science University of Tokyo (1-3, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162)

る。こうしたことから、材線虫の培養に用いている *Botrytis cinerea* (Fig. 1) に着目すると、1) 枯損マツから分離出来る⁵⁾、2) 幼齡木、芽出しのマツに接種すると病原性を示す⁵⁾、3) 培養液に切り枝を3時間浸すと葉が褐変枯死する、などの現象が見られる。そこで、*Botrytis cinerea* の代謝産物の中から、植物毒素を探索、abscisic acid (ABA) を単離同定したので報告する。

材料および方法

1. *Botrytis cinerea* の培養：培養は 500 ml 容平底培養フラスコ内に下記組成の培養液 300 ml を入れ、蒸気殺菌後、*Botrytis cinerea* を接種、20~25°C のもとで30日間培養した。培地組成は KCl 0.5 g, Mg SO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, NaNO₃ 2.0 g, 麦芽エキス (Difco) 2.5 g, ペプトン 5.0 g, ショ糖 50.0 g, アピセル 50.0 g, 水 1 L である。

2. カルスを用いた生物試験法：既報のように、アカマツ新梢より得たカルスを2週間ごとに継代培養したものをを用いた⁶⁾。生物試験には移植後10日目の増殖の盛んな時期の一塊、湿重量約 0.3 g のカルスを乾熱滅菌したガラスフィルター (直径 1 cm) に1分間のせた後、1.5% 寒天のみの培地上に移し、供試水溶液を各々 250 μ l 与えた。本実験に用いた供試物は全て dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したのち、滅菌水で希釈した。供試水溶液中の DMSO は 0.5% となるようにした。試験カルスは継代培養と同じ条件で4日間供試水溶液影響下においたのち、新しい継代培養用の培地に移植して7日間培養後、カルスの状態を観察し判定した。

3. 芽出しによる生物試験法：植木鉢に植栽された発芽後6カ月のアカマツの芽出しを水に浸し、注意深く土壤を洗い落として生物試験に供した。アルミ箔で覆った目盛付試験管に供試水溶液を 10 ml 入れて、これに芽出し3本を挿入し、27~30°C、明/暗 (16 時間/8 時間) の条件に静置して観察した。対照区の供試水溶液は4日目に 5 ml 添加した。

4. 分画方法：*Botrytis cinerea* 培養液 (pH 4.5, 6.5 L) に粉末活性炭を入れ、良く脱気したのち、活性炭を吸引濾過により濾集した。アセトンで活性炭吸着物を抽出して粗毒を得た。この粗毒を薄層クロマトグラフィー (TLC) にかけて、展開溶媒 [benzene-ethyl acetate-acetic acid (B-Ea-Aa) (40:10:1, V/V/V)] で展開した⁸⁾。そして、かき取り法により

画分1 (R_f 1.0~0.6)、画分2 (R_f 0.6~0.25)、画分3 (R_f 0.25~0.05)、画分4 (R_f 0.55~0) に分画したのち生物試験に用いた。一方、ABA などの単離方法は粗毒を分液ロートで常法にしたがって酸性画分、中性画分、塩基性画分に分画した。ABA などを含む酸性画分は、まず TLC [hexane-dioxane (H-D) (1:1, V/V)] で展開したのち、UV 254 nm の吸収によって各バンドをかき取った。これらの画分は再度 TLC によって精製した。展開溶媒は B-Ea-Aa (40:10:1, V/V/V) を用いた。

5. 分析方法：質量分析 (MS) は Hitachi M-80 spectrometer を用い、直接導入で 70 eV で測定した。核磁気共鳴 (¹H-NMR) は日本分光の JNM-FX 100, 溶媒は DMSO-d₆, 基準は TMS を用いた。TLC は silica gel 60 F 254 (E. Merck, Art. 5715) を用いた。

6. 単離した化合物との対比：市販の ABA は和光純薬製を用いた。

結 果

Botrytis cinerea を接種して30日目の培養液は pH 4.5 であった。この液から得られた粗毒の TLC による粗画分の収率を次に示した。画分1は2%、画分2は6%、画分3は38%、画分4は13%、回収率は60% であった。これら粗画分 1000 ppm 供試液のアカマツのカルスに対する細胞毒性は Table 1 に示したように画分3と4に枯死活性が認められた。一方、ABA など酸性物質を探索する目的で液性で粗毒を分画して、酸性画分 1.79 g, 中性画分 2.25 g, 塩基性画分 0.03 g を得た。TLC によって酸性画分を観察したところ、細胞毒性を示した粗毒の画分3を含む成分であったため、TLC を用いて、さらに精製単離して、27.5 mg の ABA を無色の結晶として得た。TLC 上での ABA の挙動は、B-Ea-Aa (40:10:1,

Table 1. Cytotoxicity of the fractionated crude toxin from *Botrytis cinerea* on cultured pine cells

Fraction No.	Concentration (ppm)	Cytotoxicity*
1	1000	+
2	1000	+
3	1000	++
4	1000	++
Control (0.5% DMSO)	0	-

* ++, dying; +, growth inhibition; -, none.

Fig. 2. Chemical structure of abscisic acid (ABA)

V/V/V)の展開溶媒で R_f 0.15 に単一のスプレットを与えた。検出は UV 254 nm の吸収, 20% KMnO_4 水溶液の噴霧による黄色の呈色, 20% phosphomolybdic acid の ethanol 溶液を噴霧して加熱したときの青色の呈色による。

化学構造は MS と $^1\text{H-NMR}$ によって ABA (Fig. 2) と同定した。MS m/z (rel. int.): 264(2)[M^+], 246(7), 208(8)[$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}$], 190(100)[$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}$], 162(46), 134(43), 111(20), 91(29); $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 0.92(3 H, s, H-8'), 0.95(3 H, s, H-9'), 1.81(3 H, d, $J=0.98$ Hz, H-7'), 1.97(3 H, d, $J=0.98$ Hz, H-6), 2.17(2 H, br. s, H-5'), 5.22(1 H, s, OH), 5.67(1 H, m, H-2), 5.80(1 H, m, H-3'), 6.21(1 H, d, $J=16.11$ Hz, H-5), 7.72(1 H, d, $J=16.11$ Hz, H-4)。

Botrytis cinerea の培養液から単離同定した ABA と市販の ABA をアカマツのカルスに与えて、その影響を調べ、Table 2 に示した。いずれもほぼ同様の結果を得ている。しかし粗毒の画分 3 のような枯死活性は ABA には観察されなかった。一方、ABA のアカマツ芽出しに対する影響は Table 3 に示した

Table 2. Effects of abscisic acid (ABA) isolated from *Botrytis cinerea*, on cultured pine cells in comparison with commercial ABA

Concentration (ppm)	Effects on cultured pine cells*	
	Isolated ABA	Commercial ABA
0	—	—
30	±	±
63	±	±
125	+	+
250	+	+
500	+	+

* +, growth inhibition; ±, discoloration to brown; —, none.

Table 3. Effects of abscisic acid (ABA) on the Japanese red pine seedlings

Concentration (ppm)	Water consumption (ml/three seedlings)		Wilting effect*
	4 days	7 days	
0	4.0	8.0	—
125	2.0	3.0	—
250	1.5	2.5	—
500	0.5	1.0	—

* —, none.

ように、葉が褐変するような枯死活性は 500 ppm 区の 7 日目でもまったく観察されなかった。しかし、ABA の生物活性の 1 つである気孔閉鎖に伴う水分蒸散の低下を観察した。ABA の 500 ppm 区の水分消費率は対照区の 12.5% であった。

すなわち、*Botrytis cinerea* は ABA を生合成し、それはアカマツに対して細胞毒性および枯死活性は示さなかったが、水分消費は抑制した。さらに、未同定ではあるが、細胞毒性を示す化合物の存在も示唆された。

考 察

マツの激害型枯損は萎凋病(立枯病)の範ちゅうにあり、水ストレスに伴う水分蒸散の急激な減少がマツを枯死に至らしめると考えられている。この病徴は材線虫の接種によっても観察されている⁴⁾。しかし、材線虫の培養に用いている *Botrytis cinerea* は一般的に ABA を生産することが知られており⁸⁾、生産された ABA がマツの激害型枯損の病徴である水分蒸散の抑制作用をアカマツ芽出しに発現させたことに加えて、本菌株が各種の繊維素分解酵素、中でも xylanase, CMC ase を菌体外に分泌していること(阿部岳, 未発表)などから考えて、マツの激害型枯損の原因解明に *Botrytis cinerea* で培養した材線虫を用いることは適切でないと考えられる。

マツノザイセンチュウの食習性(菌食)から考えても、糸状菌類の調査研究はマツの激害型枯損の原因解明のためにきわめて重要であることが示唆された^{6), 8)}。

謝 辞

本研究を行うにあたって、全国より枯死したマツ試料を提供された多くの方々に感謝する。また、本研究は文部省科学研究費により行った。

引用文献

- 1) 清原友也, 徳重陽山: 日林誌, 53, 210 (1971).
- 2) 小林享夫, 佐々木克彦, 真宮靖治: 日林誌, 56, 136 (1974).
- 3) 小林享夫, 佐々木克彦, 真宮靖治: 日林誌, 57, 184 (1975).
- 4) Suzuki, K., Kiyohara T.: Eur. J. For. Path., 8, 97 (1978).
- 5) 角田 廣, 辰野高司, 諸岡信久: マイコトキシソ, 23, 68 (1986).
- 6) 諸岡信久, 角田 廣, 辰野高司: マイコトキシソ, 14, 29 (1982).
- 7) Oritani, T., Ichimura, M., Yamashita, K.: Agric. Biol. Chem., 46, 1959 (1982).
- 8) Morooka, N, Tastuno, T., Tsunoda, H., Kobayashi, K., Sakurai, T.: Agric. Biol. Chem., 50, 2003 (1986).