稻胡麻葉枯病菌の生産する新抗生物質（オフィオボリン）について*

中 村 路 一, 石橋慶次郎 (三共高峰研究所)

昭和 33 年 2 月 13 日 受 理

緒 言

植物に対して種々の病害を起す所謂植物病原菌の病原性は、それ自身の代謝産物あるいは毒素がその一要因であることは一般に認められており、これら代謝産物あるいは毒素のあるものが一般の病原菌に対して抗生作用を示すことは興味ある事実である。即ち Brian は Alternaric acid¹⁻³, Griseofulvin⁴, Ustizeain⁵, Viridin^{6,7}, Gliotoxin⁸ 等について詳細な研究をし、Cook⁹ は Fusaric acid, Sambucinin, Avenacein, Fructigenin について、Arnstein は Javanicin^{10,11} について Gäumann は Lycomarasmin¹², Enniatin A, B¹³ について報告し、Robbins は Biformin¹⁴ について Freeman は Rosein II¹⁵, Trichothecin^{16,17} について報告している。

著者等は新しい抗生物質の探索の一方法として植物病原菌の代謝産物や毒素について研究中であるが、ここに新しく稻胡麻枯病菌 (*Ophiobolus Miyabeanus***) に属する菌株が他の植物病原菌、白蘚菌およびトリコモナスに対して強力な発育阻止作用を示す抗生物質を生産することを認め、この物質をオフィオボリン (Ophiobolin) と命名して結晶状に分離した。従来稻胡麻葉枯病菌が抗生物質を生産するという報告はなく、この物質の抗菌スペクトルおよび理化学的性状より新抗生物質と推定されたので報告する。

実 験 の 部

I. 実験方法

(1) 生産菌分離方法：植物病原菌の生産する抗生物質検索のため、当研究室に保存中の植物病原菌について検討した。各種植物病原菌を葡萄糖ツアベック培地に等量の麦芽糖化液 (Blg. 10°, pH 6.0) を添加した培地および等量の馬鈴薯煎汁 (200 g/l, pH 6.0) を添加した 2 種類の培地を使用、常法通り (26~28°, 4 日間) 振盪培養を行い、菌体分離後培養濾液について各種被験菌を対照としてカップ法により生育阻止作用を検討した。被験菌としては *Bacillus subtilis* PCI, *Escherichia coli* NIH, *Bacillus aroideae* Tabacco, *Bacterium solanacearum*, *Bacterium tumefaciens*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Trichophyton interdigitale*, *Piricularia oryzae* を使用した。

また種々検討の結果 *Ophiobolus Miyabeanus* が *Trichophyton interdigitale* に対して生育阻止作用を示し、その有効成分は Beckmann 分光光度計で紫外部吸収を測定した場合 237 m μ の吸光度と相関があることがわかったので、この方法により *Ophiobolus*, *Helminthosporium* の各種菌株についても有効成分生産菌の分離選択を行った。

(2) 培養方法：500 cc 容振盪フラスコに培養液 100 cc を常法通り分注滅菌し、同様に約 40 時間振盪培養した種培養を 2 cc 接種し 25~27° にて 48 時間培養した。振盪培養は振幅 6 cm, 毎分 120 回往復の振盪培養機を使用した。タンク培養は約 40 時間振盪培養した種培養を 50 l 容鉄製培養タンクで常法通り滅菌した培地に接種し、毎分培地量と等量の通気、毎分 200 回の攪拌、25~27° に約 24 時間前培養し、次に 300 l 容鉄製培養タンクに移し同様の条件で約 42 時間培養する。紫外部吸収曲線より有効成分の消長を検討しつつ最高力価に達した所で培養を終了する。

(3) 有効成分検定法：*Trichophyton interdigitale* を被験菌として Sabouraud 培地を使用し寒天稀釈法により生育阻止作用を示す最大稀釈倍数を測定し、また同じ培地および被験菌を使用してカップ法により生育阻

* On the New Antibiotics "Ophiobolin", produced by *Ophiobolus Miyabeanus*.

By Michikazu NAKAMURA and Keijiro ISHIBASHI (Takamine Research Laboratory, Sankyo Co. Ltd.)

** 本報告において *Ophiobolus* としたものは C. Drechsler: *Phytopathology*, 24, 953~983 (1934) により提唱された *Cochliobolus* に属すると考えられる。

(註) 本研究は先に報告した一新不完全菌の生産する抗生物質に関する研究第 1 報 (本誌, 30, 11 (1956)) および第 2 報 (本誌, 30, 353 (1956)) につづく一連の研究であるので、前報を夫々抗生物質に関する研究第 1 報および第 2 報とし、本報告を抗生物質に関する研究第 3 報とする。

止円の直径を測定して有効成分の力価とした。培養中の有効成分の消長は紫外外部吸収曲線を測定して有効成分検定の一方法とした。

(4) 紫外外部吸収スペクトル測定法： 共栓付試験管にて培養濾液と等量のベンゼンを加えて 10 分間振盪抽出し、分液後ベンゼンを溜去し、更にアルコール溶液として Beckmann 分光光度計により紫外外部吸収曲線を測定し、有効成分の特徴的な吸収である 237 m μ の吸光度を比較した。結晶についても同様にアルコール溶液にし測定した。

(5) 赤外部吸収スペクトルの測定： 結晶を Nujol 中およびクロロホルム溶液として、Perkin-Elmer 21 型により測定した。

II. 実験結果および考察

A. 菌の分離 当研究室に保存中の植物病原菌株について前記被験菌に対する抗菌力を検討した結果、*Ophiobolus Miyabeanus* が *Trichophyton interdigitale* に強い抗菌力を示し、*Piricularia oryzae*, *Bacterium tumefaciens* にもかなり生育阻止作用を示した。

Ophiobolus Miyabeanus の類縁株として *Ophiobolus Miyabeanus* 京都 58 号菌, *Ophiobolus Miyabeanus* 東山農試株, *Ophiobolus graminis* 農研 16', *Ophiobolus sativas*, *Helminthosporium zonatum*, *Helminthosporium sigmoideum* CAV, *Helminthosporium sigmoideum* var. *irregulare*, *Helminthosporium teres* の 8 株の培養濾液について光学的に有効成分を検討した結果 *Ophiobolus Miyabeanus* のみが有効成分を生産し、同菌株のうちでも当研究室保存中の菌株が最も多量に生産し、東山農試株、京都 58 号菌株の順に有効成分が生産されることがわかった。この有効成分を「オフィオボリン」と命名し、当研究室保存中の *Ophiobolus Miyabeanus* 株を使用して抗 *Trichophyton* 性有効成分について検討をすすめた。

B. 菌の一般的性状 オフィオボリン生産菌 *Ophiobolus Miyabeanus* の菌学的な一般的性状は次の通りである。

(1) 菌叢： 葡萄糖-馬鈴薯煎汁寒天上に良く生育す、青味を帯びた黒褐色ないし煤色で粗毛状の絨様外観を呈す。斜面培養の上端部には気菌糸が散生す。振盪培養で綿様菌体となりピレット状にならない。

(2) 分生子梗： 数本叢生して多少屈曲し、暗褐色を呈し隔壁を有す。大きさ 100~400 μ × 6~8 μ 。

(3) 分生子： 両端が細くなった新月形又は少しく一方に曲った棍棒状で脱落し易い。煤色を帯びた淡橄欖色を呈し、湿気を帯びれば速かに両端より発芽する。6~11 個の隔膜を有す。大きさ 35~85 μ × 13~18 μ 。

(4) 子囊： 未だ観察していない。

(5) 寄生性： 稲の稈葉に寄生する。

(6) 最適培養温度： 26~28°。

(7) 最適培養 pH： pH 4.5~5.5。

C. 培養条件の検討 有効成分オフィオボリン生産に最適の培養条件を検討した結果は次の通りである。

(1) 培地組成： 炭素源（葡萄糖、蔗糖、澱粉）、窒素源（硝酸ソーダ、硝酸アンモン、硫酸アンモン、ペプトン、アスパラギン、味の素、酵母エキスをおよびこれらの混合）、磷酸塩、マグネシウム塩および生長促進培地として麦芽糖化液、馬鈴薯煎汁を各要因として検討した結果、次のような培地組成が最も有効であった。

即ち蔗糖 2%，ペプトン 0.5%，酸性磷酸加里 0.5%，硫酸マグネシウム 0.25%，馬鈴薯煎汁（200 g/l）を全液量の 20% あるいは麦芽糖化液（Blg. 10°）2% 添加した培地である。

(2) 金属の影響： 培養タンク基材の検討の意味で鉄、銅、砲金の切屑を培地に添加して振盪培養した結果はいずれも影響はなかった。

(3) pH, 温度： オフィオボリン生産の最適 pH 4.5~5.5, 最適温度 26~28° で培養最適条件と一致した。

D. オフィオボリン生産菌の培養

(1) 振盪培養： 蔗糖 2%，ペプトン 0.5%，酸性磷酸加里 0.5%，硫酸マグネシウム 0.25%，馬鈴薯煎汁（200 g/l）10% 添加した培地（pH 4.5）にて、25~26° に常法通り振盪培養してその培養経過と各培養時間における有効成分の生成を、カップ法による生育阻止円の直径および Beckmann 分光光度計による吸収曲線から検討した結果は第 1 表および第 1 図に示す通りである。

培養 24 時間までは液全体に綿様菌体が繁殖して粘稠となり、更に培養時間が経過すると粘稠度は次第に減じ

第 1 表 培養時間と抗菌力および吸光度

培養条件：蔗糖 2%，ペプトン 0.5%，酸性燐酸加里 0.5%，硫酸マグネシウム 0.25%，馬鈴薯煎汁 10% 添加，pH 4.5，25° 振盪培養

培養時間	抗菌力 阻止円直径 mm	吸光度 235m μ -log T
24	10	0.340
30	20	0.345
44	30	0.670
48	22	0.425

抗菌力は培養液を検定

吸光度は培養液をベンゼン抽出，アルコール溶液として測定，

培養液の 5 倍希釈濃度

第 2 表 培養時間と抗菌力および吸光度

培養条件：蔗糖 2%，ペプトン 0.5%，酸性燐酸加里 0.5%，硫酸マグネシウム 0.25%，pH 4.5，25°，200l 鉄製タンク，200l/min 通気，200 r. p. m. 攪拌，内圧 15 lbs，消泡剤大豆油 60 cc

培養時間	抗菌力 阻止円直径 mm	吸光度 237m μ -log T
23	10	0.420(×5)
27	20	0.430(×5)
33	27	0.460(×10)
34.5	29	0.620(×10)
36	32	0.790(×10)
38	30	0.720(×10)

抗菌力は培養液を検定

吸光度は培養液をベンゼン抽出，アルコール溶液として測定

(×) は培養液に対する希釈倍数

て菌体は白色から青黒色へと着色する。約 44 時間で有効成分の生成は最高に達しその後は急速に減少する。

第 1 表に示すように有効成分の生物学的検定と，光学検定は相関した結果が得られた。

(2) タンク培養：前記と同様の培地で 44 時間振盪培養した種培養 13 本（約 1.3l）を，前記の培地から馬鈴薯煎汁を除いた培地 20l を常法通り滅菌した前培養タンクに接種して 25~27°，毎分 20l の通気，毎分 200 回の攪拌，内圧 15 lbs，消泡剤として大豆油 15 cc を分割添加しつつ 24 時間培養する。菌体はタンク壁やシャフトに附着してよく繁殖する。

この前培養を同じ培地 150l を常法通り滅菌した主タンクに接種して，25~27°，毎分 200l の通気，毎分 200 回の攪拌，内圧 15 lbs，消泡剤として大豆油 60 cc を適時分割添加して培養した。

培養中経時的にサンプリングして，菌体を分離した培養濾液について，紫外外部吸収および生物学的検定により力価を測定した。結果は第 2 表および第 2 図に示した。

主タンク培養においては培養 24 時間から有効成分が生成し，菌体はタンク壁やシャフトに附着して培養液全体

第 3 表 オフィオポリンの抽出精製

が粘稠になり，菌体は次第に着色して青黒色を呈してくる。有効成分の生成は約 36 時間で最高となり以後は減少する。

E. 有効物質の分離 第 3 表に示す通り培養濾液をベンゼンにて抽出すると有効成分は完全にベンゼンに転溶される。抽出液を減圧濃縮してベンゼンを溜去すると赤褐色油状物が残る。これをエーテルに溶解し冷蔵庫に放置すると柱状結晶が析出する。これをエーテルから再結すると白色柱状結晶の有効成分が得られる。

F. オフィオポリンの理化学的性質

(1) 定性反応：オフィオポリンは融点 181~182° の白色針状結晶で，ハロゲン，硫黄，窒素の定性反応は陰性，レーガル反応，レイモンド反応は陽

第 1 図 培養時間と紫外外部吸収曲線

第 2 図 培養時間と紫外外部吸収曲線

オフィオボリン結晶 ×100

第3図 オフィオボリンの紫外外部吸収スペクトル
 $\lambda_{\text{max}}=237\sim238\text{ m}\mu$ (0.001% Alc. sol.)

第4図 オフィオボリンの赤外部吸収スペクトル
 上図: Nujol 中の赤外吸収スペクトル 下図: Chloroform 中の赤外吸収スペクトル

性, 過マンガン酸カリを消費し, メタノール性苛性カリで黒褐色化する。Rast 法による分子量測定の結果は 377 で, 元素分析の結果から分子式は次の通り推定した。

実験値: C 74.96, H 8.33, O (16.71)%. 計算値 $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4 \cdot \text{C}$ 75.00, H 8.33, O 16.66%

オフィオボリンはクロロホルムに極めて易溶で, ベンゼン, ヘキサン, トルエン, キシレン, 醋酸ブチル, 醋酸エチル, エチルアルコール, アセトン, 四塩化炭素に易溶, 石油エーテル, エーテルに難溶, 水には甚だ難溶である。

オフィオボリンのアルコール溶液は酸性で安定で, 中性およびアルカリ性で不安定である。

(2) 光学的性質: i) 比旋光度は $C=5.3$ のクロロホルム溶液で測定した結果は $[\alpha]_D^{25}=304.5^\circ$ であった。ii) 紫外外部吸収スペクトルは Ophiobolin をアルコール溶液として測定した結果を第3図に示した。その極大吸収は $237.5\text{ m}\mu$ で吸光度は 10^{-5} 濃度で 0.275 であった。iii) 赤外吸収スペクトルは第4図に示す通りで, Nujol 中とクロロホルム溶液では多少ことなるスペクトルを示したが, Nujol 中では $-\text{OH}$ (2.84μ), ester type $\text{C}=\text{O}$ (5.76μ), keton type $\text{C}=\text{O}$ (5.89μ), $-\text{C}=\text{C}-$ (6.17μ), $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ (8.06μ), $>\text{CH}-\text{OH}$ (9.37μ) 等の存在が推定され, phenol 核, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$ はないものと考えられる。

G. オフィオボリンの抗菌スペクトル オフィオボリンは水に難溶性のため 50% アルコール溶液として連続希釈濃度の試料を調製してその 1cc 宛を各シャーレにとり, 9cc の各被検菌に

適合した培地寒天を注加してよく混和し連続稀釈法の培地とした。被検菌および培養は次の通りにした。

(1) 植物病原菌：代表的な植物病原菌 13 種をえらび蔗糖-馬鈴薯煎汁培地 (pH 7.0) にて 30° に 48~96 時間前培養した菌体を滅菌水に懸濁して被検菌とした。培養は同一培地のオフィオボリン連続稀釈培地に塗条して培養し、対照の発育を肉眼で明確に認め得るまで培養して発育阻止の最大稀釈濃度を測定した。植物病原細菌については一般病原菌の場合と同様に測定した。

(2) 一般病原菌：細菌、酵母、黴等 17 種をえらび、酵母、黴は麦芽汁寒天培地 (pH 5.6) に 30° で 24 時間前培養し、細菌は葡萄糖-ブイヨン培地 (pH 7.0) に 35° で 24 時間前培養したものを夫々寒天培地のオフィオボリン連続稀釈培地に塗条して接種後 24 時間培養した。また *Mycobacterium* はグリセリン-ブイヨン培地 (pH 7.0) に 35° に 48 時間前培養したものを、同一寒天培地のオフィオボリン連続稀釈培地に塗条して接種後 48 時間して生育阻止の最大稀釈濃度を測定した。

第 4 表 オフィオボリンの抗菌スペクトル

<i>Gloeosporium Kaki</i>	1.5	<i>Candida albicans</i>	100
<i>Gloeosporium laeticolor</i>	1.5	<i>Pestalozzia Diospyri</i>	25.0
<i>Glomerella lagenarium</i>	1.5	<i>Gibberella Saubineti</i>	50.0
<i>Macrosporium bataticola</i>	1.5	<i>Gibberella Fujikuroi</i>	50.0
<i>Corticium vagam</i>	3.0	<i>Bacterium tumefaciens</i>	12.5
<i>Alternaria Kikuchiana</i>	12.5	<i>Bacillus aroideae Tabacco</i>	>500
<i>Piricularia oryzae</i>	25.0	<i>Bacterium solanacearum</i>	>500
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	500	<i>Aspergillus oryzae</i> 0-8-1	50
<i>Bacillus agri</i>	6.25	<i>Aspergillus niger</i>	25.0
<i>Escherichia coli</i> NIH	>500	<i>Aspergillus awamori</i>	25.0
<i>Microc. pyogenes aureus</i>	12.5	<i>Penicillium chrysogenum</i>	25.0
209 P		<i>Rhizopus javanicus</i>	25.0
<i>Mycobacterium</i> 607	25.0	<i>Trichophyton interdigitale</i>	2.0
Sake Yeast	50.0	<i>Trichophyton purpureum</i>	2.0
<i>Zygosacch. sahsus</i>	50.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	5.26
<i>Torula utilis</i>	100		

(上表は micro, g/ml による発育阻止濃度を示す)

(3) トリコモナス：*Tri-*

chomonas vaginalis を浜田培地 (ペプトン 1%, 葡萄糖 1%, 食塩 0.5% を含む肉汁 < 牛肉 375 g/l, pH 7.2 > に血清 10% 添加) に 37° で 24 時間前培養して被検菌とし、オフィオボリンを極少量の 95% アルコールに溶かして浜田培地にし連続稀釈培地をつくり、被検菌を接種後 37° で 24 時間培養して生育阻止の最大稀釈濃度を測定した。結果は第 4 表に示す通りである。即ち植物病原菌中とくに柿

炭疽病菌、桃炭疽病菌、瓜炭疽病菌、甘藷黒星病菌、茄立枯病菌に対し強力に生育阻止作用を示すほか、白癬病、トリコモナスに対しても著しい生育阻止作用を示した。

H. オフィオボリンの毒性 オフィオボリンの毒性をマウスの LD₅₀ により検討した結果は次の通りであった。

経口投与	LD ₅₀ , 73 mg/kg	皮下注射	LD ₅₀ , 238 mg/kg
腹腔内注射	LD ₅₀ , 21 mg/kg	静脈内注射	LD ₅₀ , 12 mg/kg

I. 稲胡麻葉枯病の毒素としての *Ophiobolin* について オフィオボリンが稲胡麻葉枯病の毒素ではないかとの予想のもとに予備実験を行い次の結果が得られた。

(1) 地上部約 60cm に生育した陸稲 (農林 9 号) を木村氏水耕液中に移し、この水耕稲の第 1 葉に針をもって傷をあたえ 1% オフィオボリン-アセトン溶液を塗布したところ処理後 2~3 日目から胡麻葉枯病に似た黒色斑点を生じた。アセトンのみにては斑点は生じない。

(2) オフィオボリンの 10 万倍稀釈溶液で籾の発芽、発根は阻害された。

(3) 自然罹病稲葉の抽出成分中に、オフィオボリン類似の物理化学的、生物学的性質を示す区分が認められた。以上の諸点からオフィオボリンは稲胡麻葉枯病起因物質の一つではなからうかと考えられたが、その点に関しては別に報告の予定である。

要 約

(1) 植物病原菌の生産する新抗生物質を検索中に、稲胡麻葉枯病菌 (*Ophiobolus Miyabeanus*) が抗菌性および抗細菌性物質を生産することを認め、本有効成分をオフィオボリン (*Ophiobolin*) と命名してその培養条件を検討した。

(2) オフィオボリンは培養濾液をベンゼンにて抽出しエーテル溶液から柱状結晶が得られ、エーテル再結晶により融点 181° の白色柱状結晶が得られた。

(3) 紫外部および赤外部吸収曲線, その他の理化学的性質, および抗菌スペクトルからオフィオボリンは新しい抗生物質と推定された.

(4) オフィオボリンは白蘚菌, トリコモナスおよび柿炭疽病菌, 桃炭疽病菌, 瓜炭疽病菌, 甘藷黒星病菌, 茄立枯病菌等の植物病原菌の生育阻止作用を示した.

(5) マウスの LD₅₀ によりオフィオボリンの毒性を検討した.

(6) オフィオボリンの稲葉加傷塗布部位に胡麻葉枯病類似の斑点を生じ, 籾の発芽, 発根を阻害し, 自然罹病稲葉からもオフィオボリン類似の性質を示す区分が抽出されることから, 稲胡麻葉枯病起因物質の一つであると推定した.

尚著者らは昭和30年10月, 日本農芸化学会第158回関東支部講演会において本報告を発表したが, たまたま昭和32年4月, 伊太利の Orsenigo⁽¹⁸⁾ は *Helminthosporium oryzae* の培養濾液中より Cochliobolin と称する物質を結晶状にとりだし, 籾の発芽を阻害することから胡麻葉枯病の毒素であると報じているが, その融点, 紫外部吸収スペクトルからみて Ophiobolin と同一物質ではないかと思われる. しかし赤外部吸収スペクトルその他の理化学的性状, あるいは抗菌性等については一切ふれていない.

本研究に当って終始御鞭撻いただいた当研究所長 松居宗俊氏, 御協力頂いた赤外吸収測定室, 醸酵化学研究室, 農業生物研究室, および薬理研究部の諸氏に深謝の意を表す. また貴重な菌株を分与頂いた農業技術研究所病理部岩田技官, 梶原技官, 伝染病研究所佐分利氏に深く感謝す.

(1) P. W. Brian et al. : <i>Nature</i> , 165, 534 (1949).	(11) H. R. V. Arnstein, et al. : <i>Brit. Jour. Exp. Path.</i> , 27, 349 (1946).
(2) P. W. Brian : <i>Jour. Gen. Microbiol.</i> , 5, 619 (1951).	(12) E. Gäumann, O. Jaag : <i>Ber. Schweiz. Bot. Ges.</i> , 57, 3 (1947).
(3) P. W. Brian : <i>Ann. Appl. Biol.</i> , 39, 308 (1952).	(13) E. Gäumann, et al. : <i>Experientia</i> , 3, 202 (1947).
(4) P. W. Brian : <i>Ann. Bot.</i> , 13, 59 (1949).	(14) W. J. Robbins, et al. : <i>Proc. Nat. Acad. Sci.</i> , 33, 176 (1947).
(5) P. W. Brian : <i>Bot. Review</i> , 17, 407 (1951).	(15) G. G. Freeman, et al. : <i>Bioch. Jour.</i> , 49, 191 (1949).
(6) P. W. Brian, et al. : <i>Ann. Appl. Biol.</i> , 33, 190 (1946).	(16) G. G. Freeman : <i>Nature</i> , 162, 30 (1948).
(7) P. W. Brian, et al. : <i>Nature</i> , 156, 144 (1945).	(17) G. G. Freeman : <i>Jour. Gen. Microbiol.</i> , 3, 60 (1949).
(8) P. W. Brian, H. G. Hemming : <i>Ann. Appl. Biol.</i> , 32, 214 (1945).	(18) M. Orsenigo : <i>Phytopath. Zeitschr.</i> , 29, 189 (1957).
(9) A. H. Cook, et al. : <i>Nature</i> , 160, 31 (1947).	
(10) H. R. V. Arnstein, et al. : <i>Jour. Chem. Soc.</i> , 1021 (1947).	