

イネ科植物寄生性 *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum* 属菌  
のオフィオボリン毒素産生性

Productivity of Ophiobolins by Graminicolous Fungi of the Genera,  
*Bipolaris*, *Curvularia* and *Exserohilum*

月星隆雄\*・森脇丈治\*\*・吉田重信\*

Takao Tsukiboshi, Jouji Moriwaki and Shigenobu Yoshida

はじめに

オフィオボリン類は *Bipolaris* 属などポロ型の有色大型分生子を形成するいわゆるヘルミントスポリウム菌群等が産生するセスタテルペン構造を持つ宿主非特異的毒素であり、宿主細胞のイオン漏出等を引き起こして、各種病原菌の病斑形成に重要な役割を果たす。また、他の細菌、糸状菌種に抗菌性を示し、病原菌の宿主植物上での他の微生物に対する排他性を確立するための二次代謝産物としても再評価されている (Li *et al.*, 1995)。

オフィオボリン類を産生する菌種については、これまで数種の *Bipolaris*, *Aspergillus* および *Cephalosporium* 属菌で産生が報告されているが、*Bipolaris* 属類縁の *Curvularia* および *Exserohilum* 属菌を含めた広範囲の菌種で産生の有無が検討されたことはない。ここでは農林水産省 MAFF 微生物ジーンバンクで保存されているイネ科植物寄生性 *Bipolaris*, *Curvularia* および *Exserohilum* 属菌を中心にオフィオボリン類産生性を評価することを目的とする。

材料と方法

イネ科植物寄生性あるいは腐生性の *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum* 属菌 25 種 78 株を供試した (表 1)。菌株は農環研保存の農林水産省 MAFF 微生物ジーンバンク菌株、京都大学分譲株、微生物分類研保存株を用いた。各菌株を PDA (Potato Dextrose Agar, Eiken Co.) 培地で 3 日間前培養後、試験管を用いてオフィオボリンの産生量が高い CM (Complete Media; 1g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15g NaCl, 10g glucose, 1g yeast extract, 1g casein hydrolysate / 1 litre water) 液体培地で 25°C, 暗黒下で 14 日間静置培養した (月星, 1994)。この培養ろ液 3ml をエキストレルートカラム (MERCK) を用いて酢酸エチルで抽出後、濃縮乾固した。これを少量のクロロホルムに溶解し、酢酸エチル : ベンゼン : 酢酸 = 50:50:1 でシリカゲル薄層クロマト (TLC, MERCK) 上で展開後、硫酸バニリン (バニリン 0.5g, 100%エタノール 20ml, 濃硫酸 80ml) を噴霧し、50°C で 3 分加温して発色させた。標準物質としてオフィオボリン A を同時に展開して産生の有無を決定し、その他の発色スポットは当該溶媒での既知の

\* 農業環境インベントリーセンター 微生物分類研究室

Microbial Systematics Laboratory, Natural Resources Inventory Center

\*\* 農業技術研究機構 中央農業総合研究センター 北陸水田利用部

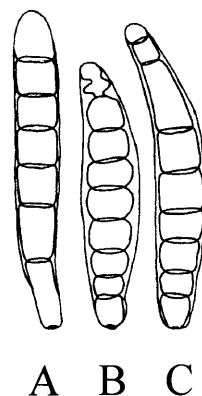
National Agricultural Research Center, National Agricultural Research Organization

インベントリー, 第 1 号, p.3-7 (2002)

Rf 値から、物質を推定した (Sugawara *et al.*, 1987; Xiao *et al.*, 1991)。

結果

培養ろ液抽出物を TLC 上で展開・発色させた結果、オフィオボリン類は全て青紫色 (BP) に発色し、各菌種でその産生パターンは全く異なった (表 2)。オフィオボリン A は Rf=0.66 の BP スポットとなり、これを産生したのは *Bipolaris* 属の *B. oryzae*, *B. zizaniae*, *B. leersiae*, *B. maydis*, *B. stenospila*, *B. sorghicola*, *B. sacchari*, *B. setariae*, *B. specifer* の 9 種で、これらは同時にオフィオボリン B, I, オフィオボリン A の置換体あるいは異性体である Epiophiobolin A, Epihydrophiobolin A, Anhydrophiobolin A と RF 値が一致するスポットを形成し、ほぼ同一のオフィオボリン類産生パターンを示した。図 1 大型分子概形



上記 9 種を除く *Curvularia* および *Exserohilum* 属種を含む他の 16 種では、*B. nakatai* および *B. sorokiniana* が Rf=0.43 の BP スポットを形成し、オフィオボリン I を産生すると推定したが、*B. nakatai* 以外はオフィオボリン A 類は産生せず、産生パターンが全く異なった。また、これらの菌種はオフィオボリン類の Rf 値部分に BP スポットではなく、オフィオボリン類以外のベンゼン環物質と考えられる桃色、青緑色等の発色を示すスポットを形成した。

表 1 供試した *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum* 属菌

菌種	菌株番号*	宿主	病害名
<i>B. australiensis</i>	MAFF306001, 306013, 306269	ローズグラス他	毛オジ病等
<i>B. bicolor</i>	KU-4, -6, -10, -52, -54	パニカム他	斑点症状
<i>B. chloridis</i>	MAFF305401	ローズグラス	すす葉枯病
<i>B. coicis</i>	MAFF305406, 305449	ジュズダマ	葉枯病
<i>B. cynodontis</i>	MAFF305369, S-Cy	バミューダグラス	白枯病
<i>B. hawaiiensis</i>	KU-Ha	—	— (腐生性)
<i>B. lasanoi</i>	MAFF305062	カゼクサ類	葉枯病
<i>B. leersiae</i>	MAFF305154, 305370, 305392, 305453	アシカキ	ごま葉枯病
<i>B. maydis</i>	MAFF306169, 511395, 511398, 511408 BM-8357, -8374, C1C2 (race T)	トウモロコシ	ごま葉枯病
<i>B. nakatai</i>	KU-B1, -B2	—	—
<i>B. nodulosa</i>	MAFF305421, 305442	シコクビエ	すす葉枯病
<i>B. oryzae</i>	MAFF305065, 305067, 305382, 305425	イネ	ごま葉枯病
<i>B. sacchari</i>	MAFF305368, Z-33	社アケラス, パールレット	眼点病
<i>B. setariae</i>	KU-29	アワ	ごま葉枯病
<i>B. sorghicola</i>	MAFF511379, BC-39, -45, -48	ソルガム	紫斑点病
<i>B. sorokiniana</i>	MAFF305069, 305070, 305400, 305416, MAFF305459, KU-37, -38	ムギ類, グラス類	斑点病
<i>B. specifer</i>	KU-Sp	—	—
<i>B. stenospila</i>	BP-1, -3, -5, -7, -9	ノシバ	褐条葉枯病
<i>B. zeicola</i>	MAFF511417, 511420, 511425, 511428, MAFF511433, BZ-1006, -1102, -1107, -1303	トウモロコシ	北方斑点病
<i>B. zizaniae</i>	MAFF305157	マコモ	ごま葉枯病
<i>C. intermedia</i>	MS-229	ソルガム	縁葉枯病
<i>C. lunata</i>	MAFF305064, 305381	イネ	にせいもち病
<i>E. microspus</i>	MAFF305155	アゼガヤ	葉枯病
<i>E. rostratum</i>	MAFF306605, 306621, Ros-3, Ros-5	パニカム	ごま葉枯病
<i>E. turcicum</i>	MAFF511442, 511444, 511445, 511447, MAFF511450, ET-19	トウモロコシ, ソルガム	すす紋病

\*: MAFF: 農林水産省微生物ゲノムバンク株, KU: 京都大学株, その他: 研究室保存株

表 2 *Bipolaris*, *Exserohilum* および *Curvularia* 属菌のオフィオボリン類産生性

菌種(孢子形態)	\ Rf 値											
	0.17	0.28 <sup>a</sup>	0.32	0.39	0.43 <sup>b</sup>	0.53 <sup>c</sup>	0.61	0.66 <sup>d</sup>	0.71 <sup>e</sup>	0.82 <sup>f</sup>	0.89 <sup>g</sup>	
スポット色	BP**	BP	Pi	Pi	BP	BP	Pi	BP	BP	BP	BP	
<i>Bipolaris oryzae</i> (LE)		+	+		+	+		+	+	+		
<i>B. zizaniae</i> (LE)				+	+	+		+	+	+		
<i>B. leersiae</i> (LE)	+(Pi)	+		+	+	+	+(Y)	+	+	+		
<i>B. maydis</i> (LE)		+		+	+			+	+	+		
<i>B. stenospila</i> (LE)		+	+	+	+	+		+	+	+		
<i>B. sorghicola</i> (LE)		+	+(B)	+	+		+	+	+	+	+	
<i>B. sacchari</i> (LE)		+			+			+	+	+		
<i>B. setariae</i> (LE)		+			+			+	+	+		
<i>B. specifer</i> (LE)		+			+			+	+	+		
<i>B. chloridis</i> (LE)												
<i>B. zeicola</i> (LC)				+(Br)	+		+(Y)	+(BG)				
<i>B. nakatai</i> (LC)				+(Br)	+	+	+	+(BG)			+	
<i>B. sorokiniana</i> (LC)				+(YBr)	+							
<i>B. cynodontis</i> (LC)	+						+(YBr)					
<i>B. bicolor</i> (LC)												
<i>B. nodulosa</i> (LO)												
<i>B. coicis</i> (S)	+											
<i>B. kusanoi</i> (S)												
<i>B. australiensis</i> (S)												
<i>B. hawaiiensis</i> (S)					+(Or)	+(Y)						
<i>Curvularia intermedia</i>	+(Or)			+(Y)			+					
<i>C. lunata</i>												
<i>Exserohilum turcicum</i>	+				+(Y)		+					
<i>E. rostratum</i>	+(Or)							+(Or)	+(Y)	+(Y)		
<i>E. micropus</i>												

酢酸エチル：ベンゼン：酢酸=50:50:1 で TLC 上で展開。硫酸バニリン噴霧により発色。

\*: LE: 大型楕円形分生子, LC: 大型棍棒形分生子, LO: 大型倒卵形分生子, S: 小型分生子

\*\* : スポット色 BP: 青紫色, Pi: 桃色, B: 青色, BG: 青緑色, YBr: 黄褐色, Y: 黄色, Or: 橙色

()内は同一カラムの他のスポットとは異なる発色をしたことを示す。

a: Ophiobolin B, b: Ophiobolin I, c: Epiophicobolin A, d: Ophiobolin A, e: Epihydrophiobolin A,

f: Anhydrophiobolin A, g: Ophiobolin C

オフィオボリン産生パターンと *Bipolaris* 属菌の分生子形態には関連が認められ、オフィオボリン A を産生した菌種はいずれも分生子の形態が大型楕円形 (LE: 長さが約 70 μm 以上, 分生子概形が楕円形) タイプであった (図 1C, 表 2)。 *B. chlorides* は LE タイプだが、例外的にオフィオボリン類の産生は認められなかった。大型棍棒形 (LC: 分生子概形が棍棒形, 図 1A) タイプの *B. zeicola*, *B. nakatai*, *B. sorokiniana*, *B. cynodontis*, *B. bicolor* および大型倒卵形 (LO: 分生子概形が倒卵形, 図 1B) タイプの *B. nodulosa* では一部の種でオフィオボリン I を産生したが、オフィオボリン A 類は産生せず、パターンが全く異なった。小型分生子 (S) タイプの各菌種はオフィオボリン類を全く産生しなかった。

## 考察

オフィオボリン類はセスタテルペン（炭素原子 25 個をもつテルペン類）で(Tsuda *et al.*, 1965; Leung *et al.*, 1984), 子のう菌有性世代をもつ *Bipolaris* 属を中心とした線菌類 (Hyphomycetes)が産生し, オフィオボリン A, B, C, D (cephalonic acid from *Cephalosporium caerulens*), F, G (from *Aspergillus ustus*), H (同左), I, L の計 9 種類が知られている (Cutler *et al.*, 1984; Sugawara *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1995)。このうちオフィオボリン A はイネごま葉枯病菌 *Cochliobolus miyabeanus* (= *Bipolaris oryzae*) の培養ろ液から宿主非特異的毒素として見出され (中村・石橋, 1958; Ohkawa and Tamura, 1966), 単独でイネ, トウモロコシなどの葉に病変を形成し, かつ根の伸長を抑制し, 特に毒性が強い。オフィオボリン A の異性体あるいは置換体としては Epiophiobolin A, Anhydrophiobolin A, Epihydrophiobolin A 等が知られ, このうち Epiophiobolin A が最も毒性が強い。毒性は細胞内のイオンやグルコースの漏出を引き起こすことによるが (Tipton *et al.*, 1977; Chattopadhyay and Samaddar, 1980; Cocucci *et al.*, 1983), 他にもカルシウムイオンの受容体であるカルモジュリンに強い阻害作用を示すことが知られる (Leung *et al.*, 1985)。また, これらの物質は他の糸状菌に対しても抗菌作用をもつことが知られ, 病原菌の植物体上での排他的地位確立に関与するとされている。オフィオボリン I は Epihydrophiobolin A の末端が第 1 アルコールに置換されたもので, Hydroxyphiobolin I 等の置換体が知られるが, いずれも毒性は弱い。

オフィオボリン類を産生する *Bipolaris* 属菌は, これまで *B. oryzae* の他, *B. maydis* (race O, T), *B. setariae*, *B. sorghicola* が報告されているが (Nukina and Marumo, 1976; Sugawara *et al.*, 1987), 今回の報告で *B. zizaniae*, *B. leersiae*, *B. stenospila*, *B. sacchari*, *B. specifer* については, オフィオボリン類の産生が初めて認められた。このうち *B. zizaniae* および *B. leersiae* は *B. oryzae* と自由に交配し, 同種とされているが (日本植物病名目録, 2000), オフィオボリン類の産生パターンからもこのことが裏付けられた。また, オフィオボリン類を産生する *Bipolaris* 菌群の多くが周辺組織の壊死を伴った大型斑を形成するのに対し, 非産生の菌群は主にすじ状, 斑点状病斑の形成にとどまり, オフィオボリン類の産生が病斑形成に大きく関わることを示唆された。

オフィオボリン類を産生したのは大型分生子を形成する *Bipolaris* 属菌種に限られ, 小型分生子を形成する *Bipolaris* 属および近縁の *Curvularia*, *Exserohilum* 属菌では全く認められなかった。*Bipolaris* 属菌は核遺伝子 rDNA-ITS 領域の塩基配列により, 大型分生子グループと *Curvularia* 属菌を含む小型分生子グループに分かれることが知られるが (Burbee *et al.*, 1999), オフィオボリン類産生パターンからもこのことが支持された。また, 大型分生子グループ内でもオフィオボリン A 類を産生したのは大型楕円形タイプの菌種に限られ, この形態が本属菌の遺伝的類縁性を反映している可能性がある。しかし, LE, LC など分生子形態によるグループ分けは現在のところ分子系統学的には支持されず, またオフィオボリン類の産生の有無と宿主植物種などに関連は認められなかった。

## 謝辞

供試菌株を分譲頂いた京都大学農学部微生物環境制御学講座, 津田盛也教授に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Burbee, M. L. *et al.* (1999): *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, **91**, 964-977
- 2) Chattopadhyay, A. K. and K. R. Samaddar (1980): Comparative physiological changes induced by *Helminthosporium oryzae* infection and ophiobolin. *Phytopath. Z.*, **98**, 118-126
- 3) Cocucci, S. M. *et al.* (1983): Effects of Ophiobolin A on potassium permeability, transmembrane electrical potential and proton extrusion in maize roots. *Plant Sci. Lett.*, **32**, 9-16
- 4) Cutler, H. G. *et al.* (1984): Ophiobolins G and H: New fungal metabolites from a novel source, *Aspergillus ustus*. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 778-782
- 5) Leung, P. C. *et al.* (1984): Ophiobolin A, a natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2742-2747
- 6) Leung, P. C. *et al.* (1985): Role of calmodulin inhibition in the mode of action of Ophiobolin A. *Plant Physiol.*, **77**, 303-308
- 7) Li, E. *et al.* (1995): Microbial metabolites of Ophiobolin A and antimicrobial evaluation of ophiobolins. *J. Nat. Prod.*, **58**, 74-81
- 8) 中村路一・石橋慶次郎(1958): 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. *農化*, **32**, 739-744
- 9) 日本植物病名目録(2000): 日本植物病理学会編, 日本植物防疫協会, 東京, 857p.
- 10) Nukina, M. and S. Marumo (1976): Aversion factors, antibiotics among different strains of a fungal species, Aversion factors of *Cochliobolus setariae*. *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 2121-2123
- 11) Ohkawa, H. and T. Tamura (1966): Studies on the metabolites of *Cochliobolus miyabeanus*, Part I. Ophiobolosin A and Ophiobolosin B. *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 285-291
- 12) Sugawara, F. *et al.* (1987): Phytotoxins from the pathogenic fungi *Drechslera maydis* and *Drechslera sorghicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3081-3085
- 13) Tipton, C. L. *et al.* (1977): Effects of Ophiobolin A on ion leakage and hexose uptake by maize roots. *Plant Physiol.*, **59**, 907-910
- 14) Tsuda, K. *et al.* (1965): The structure of ophiobolin, a C<sub>25</sub> terpenoid having a novel skeleton. *J. American Chem. Soc.*, **87**, 4968-4970
- 15) 月星隆雄(1994): トウモロコシごま葉枯病菌の病原性変異及び宿主の抵抗性に関する研究. 千葉大院博乙(農学)第63号
- 16) Xiao, J. Z. *et al.* (1990): Phytotoxins produced by germinating spores of *Bipolaris oryzae*. *Phytopathology*, **81**, 58-64