

Hypocrea 属菌が生産する抗菌性物質の木材腐朽菌に対する生理作用

誌名	財団法人日本きのこセンター菌蕈研究所研究報告 = Reports of the Tottori Mycological Institute
ISSN	03888266
著者	石川, 久雄 沖, 妙 桐山, 久美
巻/号	14号
掲載ページ	p. 105-110
発行年月	1976年7月

Hypocrea 属菌が生産する抗菌性物質の 木材腐朽菌に対する生理作用*

石川久雄**・沖 妙**・桐山久美**

Hisao ISHIKAWA**, Tae OKI** and Hisami KIRIYAMA**: The toxic function of the anti-fungal compounds prepared by some *Hypocrea* species to wood-rotting fungi.

Abstract

An investigation on the anti-fungal compounds prepared by some *Hypocrea* species and on the toxic function of the compounds to wood-rotting fungi is presented.

The main anti-fungal compounds isolated from the ether extracts of the cultures of *Trichoderma viride* PERS. ex S. F. GRAY aggr. and *Trichoderma harzianum* RIFAI aggr. were trichodermin, trichodermol and an unidentified compound (Rf 0.08). On the other hand, anthraquinone pigments, emodin, chrysophanol and hypochrysophanin were only isolated from the ether extract of the culture of *T. harzianum* RIFAI aggr.

The toxic function of above anti-fungal compounds to wood-rotting fungi was the following order;

trichodermin \approx an unidentified compound > trichodermol > hypochrysophanin.

It was also found that the growth of white-rotting fungi in the presence of anti-fungal compounds are more inhibited than that of brown-rotting fungi.

I 緒 言

Trichothecene 化合物の動物および微生物におよぼす毒性とその生化学的な機構は、次第に明らかになり、12, 13-epoxytrichothecene 骨格の構造上の差と置換基の種類によって生理作用に選択性が生ずることがわかってきた (GROVE 1969; BAMBURG & STRONG 1971; YOSHIZAWA & MOROOKA 1974, 1975; CUNDLIFFE, CANNON & DAVIS 1974)。石川ら (石川・沖・沢田 1973) は前報で *Hypocrea* 属菌が trichothecene 化合物である trichodermin と trichodermol を生成する菌群と gliotoxin を生成する菌群とに大別されることを明らかにした。

本報では、九州地区でシイタケ栽培に大きな被害を与えている *Trichoderma harzianum* RIFAI aggr. と抗菌作用は比較的弱い幅広く分布してシイタケ栽培に被害を与えている *Trichoderma viride* PERS. ex S. F. GRAY aggr. が生産する抗菌性物質の分離とその構造決定を行なった結果について報告する。

また、抗菌性物質を含む寒天培地またはブナ木片を使って、*Hypocrea* 属菌が生産する抗菌性物質の限界濃度を、食用菌または木材腐朽菌の菌糸の伸長とブナ木材の腐朽度から調べた。

* 菌草研究所研究業績, 第 109 号 (Contributions from the Tottori Mycological Institute. No. 109).

** 愛媛大学農学部, 松山市 (Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama, Japan).

II 供試菌および実験方法

1. 供試菌

Hypocrea 属菌: *Trichoderma harzianum* RIFAI aggr. (TMI 60622), *Trichoderma viride* PERS. ex S.F. GRAY aggr., *Hypocrea peltata* (JUNGH) SACC. (M13; TMI 60585) と *Gliocladium fimbriatum* GILMAN et ABBOTT (CBS No. 176, 27).

木材腐朽菌: *Coriolus versicolor* (FR.) QUÉL. (カワラタケ) と *Tyromyces palustris* (BERK. et CURT.) MURR. (オオウズラタケ).

食用菌: *Lentinus edodes* (BERK.) SING. (シイタケ), *Pholiota nameko* (T. ITO) S. ITO et IMAI (ナメコ), *Flammulina velutipes* (FR.) SING. (エノキタケ), *Auricularia polytricha* (MONT.) SACC. (アラゲキクラゲ), *Pleurotus cornucopiae* (PERS.) ROLLAND (タモギタケ), *Pleurotus ostreatus* (FR.) QUÉL. (ヒラタケ).

2. 培養条件

Hypocrea 属菌の培養 供試菌は、先づ WEINDLING 培養液 (pH 3.5) 200 ml に接種し、26°C で7日間静置培養して *Hypocrea* 属菌培地を作り、これを同培養液 30 l に移植し、同じ条件下で通気しながら20日間培養した。

木材腐朽菌の培養 麦芽エキス 10 g, グルコース 25 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, 寒天 25 g を水道水 1 l に溶解して作った寒天培地を使って、木材腐朽菌を 26°C で培養した。

食用菌の培養 ジャガイモ寒天 (PSA) 培地を使って 26°C で食用菌を培養した。

3. 抗菌性物質の単離

供試 *Hypocrea* 属菌の大量培養した WEINDLING 培養液は、約 1/10 までに減圧濃縮したのち、HCl で pH 2.5 とし、エーテルで連続抽出した。抽出物は常法に従って酸性、フェノール性および中性の各区分に分け、それぞれを少量のアルコールに溶解し、TLC 法 [和光シリカゲル B-5, 250 m μ の厚さ、ベンゼン・酢酸 (80:10 V/V) 混液] で展開し、前報で述べた方法で含まれる化合物の R_f 値を求めた (名護・石川 1970; 石川・沖・沢田 1973; SORENSON, SNELLER & LARSH 1975)。TLC 上の抗菌性を示す主な化合物のスポットはかきとり、アルコールで抽出し、和光シリカゲルカラムを使ってベンゼンで不純物を除いて精製し、抗菌性物質を単離した。元素分析、混融試験と IR スペクトルの結果から、抗菌性物質を同定した。

4. アンストラキノン系色素の単離

3 で述べたフェノール区分を同じ TLC 法で分画し、紫外線照射で橙色に蛍光し、 $\text{Mg}(\text{OAc})_2 \cdot \text{メタノール}$ 溶液で紫色に呈色する TLC 上のスポットを集め、アセトンで抽出し、ベンゼンで精製することによってアンストラキノン系色素を単離した。標品との混融試験、IR および UV スペクトルと R_f 値から、単離色素を固定した。

5. 抗菌性試験菌

a) *L. edodes* 菌糸を十分生育させた PSA 培地に、供試 *Hypocrea* 属菌培養液のエーテル抽出物 (酸性、フェノール性および中性各区分) の 50% アルコール溶液の一定量を滴下し、菌叢表面の状態を経時的に観察して、抽出物の抗菌性の程度を調べた。

b) *H. peltata* (M13) および *T. harzianum* を大量培養して得た培養液のエーテル抽出物中の中性区分とフェノール区分を、TLC を使って分画し、各スポットを集めて得たアルコール抽出物の一定量を寒天培地に加え、*L. edodes*, *C. versicolor* または *T. palustris* を 26°C で培養した。各菌種の菌糸伸長から抗菌性物質の抗菌性の限界濃度を求めた。また、単離された抗菌性物質が抗菌性を示す限界濃度を同じ方法で求めた。

c) 木材腐朽菌または食用菌を、250 ml の三角フラスコを使った PSA 培地 50 ml に接種し、26°C で十分培養したのち、ブナ木片 (直径 7×長 15 mm) に (b) で述べたエーテル抽出物 (中性およびフェノール性各区分)、または単離した抗菌性物質の一定量を 50% アルコールに溶解して吸収させたもの 7 枚を加え、26°C で3ヶ月間腐朽させた。その間、時々殺菌水を補給した。このときのブナ木片の重量減少量から腐朽度を求めた。

III 結果および考察

1. *T. harzianum* と *T. viride* が生産する抗菌性物質とアンスラキノン系色素

2 種類の *Trichoderma* 菌を、それぞれ大量培養した培養液のエーテル抽出物のうち、中性区分が *L. edodes* 菌糸に対する抗菌性が最も強く、ついでフェノール区分、酸性区分の順に抗菌性は弱くなった。中性区分のうち、TLC 法で Rf 0.08, Rf 0.23 と Rf 0.56 に相当するスポットを与える物質が 5, (a) で述べた方法で強い抗菌性を示した。

残りの中性区分を TLC 法で分画し、分離精製した結果、Rf 0.23 を与える mp 115~116°C の trichodermol と Rf 0.56 を示す淡黄色油状の trichodermin が得られ、融点および分析結果は標品と一致した。また、標品と一致した IR 吸収スペクトルを与えた (名護・石川 1970)。

Trichodermin MW 293; Found C 69.70%, H 8.30%; Calcd., C₁₇H₂₄O₄, C 69.83%, H 8.29%; [α]_D²⁰ -10.0; yield, 15~25 mg/culture 30 l.

Table 1. Anti-fungal activity of the ether extracts of *Hypocrea* cultures to *Lentinus edodes* (BERK.) SING.

Species	Ether extracts (mg/ml)		
	Neutral fraction	Phenolic fraction	Acidic fraction
<i>H. peltata</i> (TMI 60585)	1.6~2.0	3.5~3.7	5.0~6.0
<i>T. harzianum</i> (TMI 60622)	1.3~1.8	3.3~6.6	5.5~6.4
<i>T. viride</i>	3.4~4.0	6.2~6.6	10.0~11.5
<i>G. fimbriatum</i> (CBS No. 176,27)	2.5~3.3	7.5~8.3	13.0~15.0

The measuring values indicate the limiting concentration of cytolysis to the mycelium of *L. edodes*.

Table 2. Anti-fungal activity of the ether extracts of *Hypocrea* cultures to wood-rotting fungi

Species	Rf values*	<i>H. peltata</i>		<i>T. harzianum</i>	
		Neutral fraction	Phenolic fraction	Neutral fraction	Phenolic fraction
<i>L. edodes</i>	0.08	0.20~0.24 mg	0.33~0.38 mg	0.19~0.22 mg	0.40~0.44 mg
	0.23	0.45~0.52		0.47~0.50	
	0.52				
	0.56	0.07~0.11		0.06~0.10	
<i>C. versicolor</i>	0.08	0.23~0.27	0.22~0.26	0.25~0.29	0.25~0.31
	0.23	0.45~0.50		0.41~0.46	
	0.52				
	0.56	0.07~0.10		0.05~0.08	
<i>T. palustris</i>	0.08	0.82~0.86		0.77~0.84	
	0.23	1.63~1.90		1.55~1.73	
	0.52	1.90~1.97		1.71~1.86	
	0.56	0.80~0.88		0.66~0.74	

* Developing solvent of TLC (Wako silica gel B-5): the mixture (80 · 10 V/V) of benzene and acetic acid.

The measuring values indicate the limiting concentration (mg/ml, culture) of main anti-fungal compounds to the growth of mycelium of wood-rotting fungi.

Trichodermol MW 260; Found C 71, 89%; H 8, 80%; Calcd., $C_{15}H_{22}O_3$, C 71, 97%, H 8, 86%; $[\alpha]_D^{20}$ -33, 0; yield, 10~17 mg/culture 30 l.

Rf 0, 08 付近のスポットは、紫外線照射下で淡白青色の強い蛍光を発する物質で強い抗菌性を示した。同じ Rf 値を与える TLC 上のスポットをアルコールで抽出し、再び TLC 法 [和光ゲル B-5, 厚さ 250 μ m, アセトン・ベンゼン (3:2 V/V) 混液] で展開したところ、Rf 0, 08, Rf 0, 12, Rf 0, 52 と Rf 0, 96 の4つの化合物に分画された。前2者の Rf 値を与える物質は強い抗菌性を示した。これらの化合物の単離と構造については後に報告する。これら2つの未知の化合物は、既に報告したすべての *Hypocrea* 属菌によっても生成された (石川・沖・沢田 1973)。

T. harzianum の大量培養液のエーテル抽出物から得られたフェノール区分を、実験の部で述べた TLC 法で展開し、精製した結果、Rf 0, 28, 0, 52 と 0, 80 を与えるアンスラキノン系化合物を数十 mg を得た。

Emodin [Rf 0, 28, mp 255, 5~265 C, M^+ 270, found: C 66, 39%; H 3, 80%, λ max nm (EtOH) 222, 252, 265, 289, 437, chalcated quinone 1623 cm^{-1} , free quinone 1672 cm^{-1} , free phenolic OH 344, 8 cm^{-1} , chalcated phenolic OH 3050 cm^{-1}]

Hypochrysophanin (Rf 0, 52, d p, 205~206 C)

Chrysophanol [Rf 0, 80, mp 194~195 C, M^+ 254, found C 70, 51%, H 3, 85%, λ max nm (EtOH) 222, 252, 278, 285, 432, chalcated quinone 1615 cm^{-1} , free quinone 1677 cm^{-1} , chalcated phenolic OH 3002 cm^{-1}]. しかし、これらのアンスラキノン系色素は、*T. viride* の大量培養液からは検出されなかった。各単離化合物の UV および IR スペクトル分析と混融試験の結果、標品と一致した結果を示した (名護・石川 1970; 石川・沖・沢田 1973)。

2. 抗菌性物質の抗菌作用

供試 *Hypocrea* 属菌の大量培養液から得たエーテル抽出物の酸性、フェノール性および中性の各区分の一定量を溶した 50% アルコール溶液を、*L. edodes* の PSA 培地に滴下し、菌叢表面の変化を観察した結果、菌糸の崩壊、ついで褐変を起した。菌糸の形状変化が観察される限界濃度を第1表に示す。*T. harzianum* は、*H. peltata* (M 13) と同じ程度の *L. edodes* 菌糸に対する抗菌性を示した。他の供試 *Hypocrea* 属菌は、上記の菌より抗菌性が弱かった。*Hypocrea* 属菌種に関係なく、中性区分>フェノール区分>酸性区分の順に強い抗菌性を与えた。

H. peltata (M 13) および *T. harzianum* の大量培養液のエーテル抽出物から得たフェノール区分と中性区分を TLC 法で分画し、アルコール抽出して得た抗菌性物質を含む PSA 培地で、*L. edodes*, *C. versicolor* と *T. palustris* を培養し、菌糸の伸長から抗菌性の限界濃度を求めた結果、菌種によって限界濃度に著しい違いが認められた (第2表, 第3表)。しかし、供試 *Hypocrea* 属菌の種に関係なく、TLC 法で同じ Rf 値を与える化合物の木材腐朽菌に対する抗菌性限界濃度はほぼ同じであった。また、単離した抗菌性物質は、trichodermin>Rf 0, 08 を与える化合物 \approx trichodermol \approx hypochrysophanin の順に強い抗菌性を示し、赤色腐朽菌である *T. palustris* よりも、*L. edodes* および白色腐朽菌 *C. versicolor* に対して強い抗菌作用を与えた。菌糸伸長

Table 3. Anti-fungal activity of compounds isolated from *Hypocrea* cultures to wood-rotting fungi

Species	Un-identified compound (Rf 0.08)*	Trichodermol (Rf 0.23)*	Trichodermin (Rf 0.56)*	Hypochrysophanin (Rf 0.52)*
<i>L. edodes</i>	0.07~0.09 mg	0.15~0.20 mg	0.02~0.03 mg	0.15~0.20 mg
<i>C. versicolor</i>	0.09~0.11	0.21~0.30	0.05~0.07	0.25~0.28
<i>T. palustris</i>	0.33~0.40	0.88~0.96	0.18~0.20	0.90~1.00

* Rf values were measured by TLC method shown in Table 2.

The measuring values of antifungal activity indicate the limiting concentration (mg/ml, culture) of antifungal compounds to the growth of mycelium of wood-rotting fungi.

を抑制する trichodermin の限界濃度は、*T. palustris* では 0.18~0.20 mg/culture, 1 ml, *C. versicolor* では 0.05~0.07 mg/culture, 1 ml, *L. edodes* では 0.02~0.03 mg/culture, 1 ml であった。trichodermol の4位の水酸基がアセチル基で置換された trichodermin が、より強い抗菌作用を与えることは、12, 13-epoxytrichothecene 化合物の置換基の種類によって生理活性に選択性が生ずる既往の結果を裏付けるものである (GROVE 1969; YOSHIZAWA & MOROOKA 1974, 1975)。

H. peltata (M13) と *T. harzianum* の培養液から得たエーテル抽出物の中性区分またはフェノール性区分を TLC 法で分画し、抗菌性を示すスポットをアルコールで抽出し、精製して得た化合物、またはエーテル抽出物の一定量をブナ木片に吸収させ、木材腐朽菌または食用菌で3ヶ月間腐朽させた結果、菌種によって腐朽度に著しい違いが認められた(第4表)。また、単離抗菌性物質のうち、trichodermin を吸収させたブナ木片が最も腐朽され難かった。ついで、Rf 0.08 を与える化合物、trichodermol の順に木材腐朽を抑制する作用が劣ることがわかった。

以上述べた結果から、供試菌 *Hypocrea* 属菌が生産する主な抗菌性物質は、trichodermin, trichodermol, hypochrysophanin と Rf 0.08 を与える化合物であって、菌種間の抗菌性の差は、これらの抗菌物質の生成量の差に起因することが考察された。

Table 4. Analytical results of degradation of anti-fungal compound-contained beech wood with wood-rotting fungi

A. Decrease in the weight of ether extract*-contained wood after fungal degradation

Species	Extract added into wood		
	1.0 mg/g		Control
	Neutral fraction	Phenolic fraction	
<i>P. nameko</i>	0.586 g	0.848 g	1.004 g
<i>E. veltipes</i>	0.337	0.524	0.713
<i>A. polytricha</i>	0.624		1.185
<i>P. cornucopiae</i>	0.498		0.852
<i>P. ostreatus</i>	1.087	1.540	1.700
<i>L. edodes</i>	0.175	0.280	0.564

B. Decrease in the weight of anti-fungal compound*-contained wood after fungal degradation

Species	Anti-fungal compound added into wood (0.1 mg/g)			Control
	Un-identified compound	Trichodermol	Trichodermin	
<i>L. edodes</i>	0.53 ~ 0.075 g	0.480 ~ 0.515 g	0.032 ~ 0.053 g	0.590 ~ 0.625 g
<i>C. versicolor</i>	0.080 ~ 0.102	0.326 ~ 0.401	0.046 ~ 0.054	0.602 ~ 0.655
<i>T. palustris</i>	1.112 ~ 1.252	1.327 ~ 1.420	1.020 ~ 1.255	1.615 ~ 1.702

* Ether extract or anti-fungal compounds were isolated from the culture of *H. peltata* (TMI 60585)

Conditions of fungal degradation: at 25 C for 3 months.

IV 結 論

1. *T. harzianum* と *T. viride* を大量培養し、エーテル抽出物に含まれる主な抗菌性物質を調べた結果、trichodermin, trichodermol, hypochrysophanin と Rf 0.08 を与える化合物があることがわかった。

しかし、*T. viride* は、*T. harzianum* が生成するアンスラキノン系化合物 emodin, chrysophanol と hy-

pochrysophanin を生産しなかった。

2. 供試 *Hypocrea* 属菌の大量培養液のエーテル抽出物を分画して得た酸性、フェノール性および中性の各区分、または単離した抗菌性物質を使って、木材腐朽菌と食用菌の菌糸の伸長またはブナ木片の腐朽の抑制効果を調べた。その結果、trichodermin が上記の菌の生長と木材腐朽を最もよく抑制し、Rf 0.08 を与える化合物、trichodermol と hypochrysophanin の抗菌性はそれより劣っていた。また、これらの抗菌性物質の木材腐朽菌に対する抗菌作用は、白色腐朽菌よりは赤色腐朽菌の方が強く、抗菌性物質の種類によってブナ材の腐朽度に著しい差が認められた。

V 謝 辞

Hypocrea 属菌および食用菌の培養菌株を分譲していただいた菌茸研究所小松光雄博士と木材腐朽菌をいただいた京都大学木材研究所西本考一博士に深謝する。

引 用 文 献

1. BAMBURG, J.R. and F.M. STRONG (1971) 12, 13-Epoxytrichocheccenes. In S. KADIS, A. CIEGER and S.J. AJL (ed.), *Microbial toxins*, 7, Fungal toxins. Academic Press. Inc. New York.
2. CUNDLIFFE, E., M. CANNON and J. DAVIS (1974) Mechanisms of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*: 30~34.
3. GROVE, J. F. (1969) The cytotoxicity of some transformation products of diacetoxyscirpenol. *Chem. Commun.* 1473~1478.
4. 石川久雄・沖 妙・沢田房江 (1973) *Hypocrea* 属菌が生産する抗菌性物質について. 菌茸研報. 10 : 637~645.
5. 名護 博・石川久雄 (1970) *Hypocrea austrograndis* HASHIOKA & KOMATSU が生産するアンスラキノ系色素と抗菌性物質について. 木材誌. 16: 294~299.
6. SORENSON, W. G., M.R. SNELLER and H.W. LARSH (1975). Qualitative and quantitative assay of trichothecin: Amycotoxin produced by *Trichothecium roseum*. *Appl. Microbiol.* 29: 653~657.
7. YOSHIKAWA, T. and N. MOROOKA (1974) Studies on the toxic substances in the infected cereals (III). Acute toxicities of new trichocheccene mycotoxins: deoxynivalenol and its monoacetate. *Jap. J. Food Hyg.* 15: 261~269.
8. ——— (1975) Comparative studies on microbiol. and chemical modifications of trichothecene mycotoxins. *Appl. Microbiol.* 30: 38~43.