

糸状菌No.2489-11株の生産するキウリ子葉クロフィル生成促進活性物質

誌名	玉川大学農学部研究報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University
ISSN	0082156X
著者名	東岸,和明 石山,忠之 沖本,陽一郎
発行元	玉川大学農学部
巻/号	32号
掲載ページ	p. 51-62
発行年月	1992年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



糸状菌 No.2489-11 株の生産する キウリ子葉クロフィル生成促進活性物質

東岸和明, 石山忠之, 沖本陽一郎

緒 言

糸状菌の生産する対植物生理活性物質はその作用によって大きく二種類に分けられる。一つは、イネ馬鹿苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) の生産する一群のジベレリンに代表される植物ホルモン物質、あるいはその作用がこれに類似する植物ホルモン様物質である。他方は、植物に対して毒性を示すファイトトキシンである。昨年度、筆者らが報告 (東岸ら 1991 年) したロリジン A やデカンピンはマイコトキシンとして報告されている物質である。両物質の植物切片の伸長や発芽種子の生育などの生理作用を検定する際に、用いた植物の種類によってその阻害作用がわずかず異なっており、中には逆に促進作用を示す例も見られた。このような生理作用について、そのメカニズムが明らかにされている例は非常に少なく、大変興味深い点でもある。

ある一つの物質が様々の作用 (現象) を示す場合には、一般的にその物質の細胞内での作用点をただ一点のみで理解することは非常に難しいと思われる。観察される種々の生理作用が全く異なる代謝系や細胞内器官に依存する場合や、あるいは異なる組織において違った作用が現れる様な場合にはその解析は困難を伴うが、一方では非常に興味深いことでもある。

筆者らは、イネラミナジョイント屈曲活性を指標としての生理活性物質の検索を行っており、その中で、土壌より分離した *Penicillium* 属の一菌株である No.2489-11 株はポジティブコントロールとして用いているインドール酢酸 (以下 IAA と略す) と同程度の屈曲活性を示す物質を生産することを見出した。そこで、本報告では No.2489-11 株の生産する活性物質の単離精製を行い、その化学構造および植物に対する作用を検討した結果について述べる。

材 料 と 方 法

1. 供試菌株の培養

活性物質の生産菌として供試した *Penicillium* 属の一菌株 No.2489-11 株は東京都港区白金台の土壌から分離したものである。

供試菌株はまず PC II 培地 (グルコース, 10 g; ポリペプトン, 2 g; 酵母エキス, 1 g; 肉エキス, 1 g; L-アスパラギン, 0.5 g; 塩酸チアミン, 10 mg/l; pH 7) 15 ml を分注した試験管を用

いて 27°C で 2 日間前々培養した。次いで、この培養物を V 8 培地 (V 8 野菜ジュース, 200 ml ; グルコース, 20 g/l ; pH 7) 100 ml を分注した 500 ml 容三角フラスコに 2 ml ずつ接種して 27°C で 4 日間前培養した。本培養は 30 l 容ジャーフェーマンターを用い、V 8 培地 15 l に前培養物 300 ml を接種して 27°C で培養 (通気, 15 l/min ; 攪拌, 400 rpm.) した。

2. 2489 物質の機器分析

単離精製した 2489 物質の NMR スペクトル測定は、本物質の重クロロホルム溶液を試料として日本電子の GX-270 型装置により、また、質量分析はメタノール溶液を試料として日本電子の JMS-AX 505 W 型装置を用いて直接導入法により行った。

3. イネラミナジョイント試験法およびカラシナ幼根伸長試験法

試験方法は前報 (東岸ら 1991) を参照。

4. ダイコン下胚軸および子葉柄伸長試験法

ダイコン (リソウ) 種子をバーミキュライト上に播種して 27°C で発芽させ、草丈が 3~4 cm になったものを根を傷つけないように引き抜いて試験に供試した。

検定試料はアセトン溶液 (1000 ppm) として調製し、適宜段階希釈した。この試料液は 0.2 ml ずつ検定ビン (径 2 cm, 高 3 cm) にとり、さらに界面活性剤 (ノニポール, 100 ppm/アセトン) 0.2 ml を加えてよく攪拌した後、デシケーター内、減圧下で乾固させた。乾固した試料は蒸留水 2 ml を加えて十分に懸濁させた。

上述のダイコン稚苗は下胚軸部、外子葉柄および内子葉柄の長さを測定した後、3 本を 1 組として根部を被検液に浸漬して 27°C 暗所で 4 日間培養した。

伸長活性は、検定後に下胚軸部、外子葉柄および内子葉柄の長さを測定することにより求めた。

5. インゲン第二節間伸長試験法

インゲン (ツルナシ) の種子を川砂上に播種して 27°C で発芽させ、さらに中央小葉が伸び始めた状態で第二節間が 1 mm 以下に育ったものを用いた。

試料液は 0.5 ml ずつ試験管 (径 8 mm, 高 6 cm) にとり、デシケーター内、減圧下で乾固させた。乾固した試料はラノリンのアセトン溶液 (500 ppm) 0.5 ml に溶解してよく攪拌した後、ガラス板上に少量ずつ滴下しながら風乾させて試料とラノリンとの混合物として検定に供した。

上記発芽インゲン稚苗の中央小葉の背方向の苞をピンセットで除いた部分に細いヘラで試料を塗布して、27°C 明条件下で 2 日間培養した。伸長活性は検定後に第二節間の長さを測定することによって求めた。

6. キウリ子葉肥大試験法

キウリ (アオナガジバエ) 種子をバーミキュライト上に播種して暗条件下で胚軸が 6~8 cm になるまで生育させ、子葉を切り取って子葉切片とした。

検定試料液は 0.2 ml ずつシャーレ (径 3 cm, 高 1 cm) にとり、これに界面活性剤 (ノニポール, 100 ppm/アセトン) 0.2 ml を加えてよく攪拌した後、デシケーター内、減圧下で乾固させた。乾固した試料に 40 mM 塩化カリウム溶液 2 ml を加えて超音波法により懸濁させた。

子葉切片は4枚を1組とし、重量を測定した後に被検液に浸漬して27℃暗所で4日間培養した。肥大活性は検定後に子葉切片の重量を測定することにより求めた。

7. キウリ子葉クロロフィル生成試験法

キウリは前項に述べたと同様の条件で育成し、子葉を子葉柄基部を残して切断して子葉切片2枚一組として検定に用いた。

試料液を0.2 ml ずつシャーレ（径3 cm, 高1 cm）にとり、これに界面活性剤（ノニポール, 100 ppm/アセトン）0.2 ml を加えてよく攪拌した後、デシケーター内、減圧下で乾固させた。乾固した試料は40 mM塩化カリウム溶液2 ml を加えて超音波により懸濁させた。

上述のキウリ子葉切片は試料液に浸漬し、蛍光灯下で18時間培養した。クロロフィルの定量は次項に述べる方法により行った。

8. クロロフィルの定量方法

検定後のキウリ子葉はテトラヒドロフラン（以下 THF と略す）2 ml 中で磨砕することによりクロロフィルを抽出した。この磨砕物はクロロホルム2 ml と飽和食塩水1 ml とを加えて振盪することによりクロロフィルをクロロホルム層に転溶させた。この操作は合計3回繰り返した後、クロロホルム層をあわせて濃縮乾固させ、THF 1 ml に溶かして定量分析用の試料液とした。

クロロフィルの HPLC 分析はシマヅ LC-7 A 型装置および DuPont Zorbax ODS カラム (4.6 x 250 mm) を用いて行った。展開溶媒系はクロロホルム：アセトニトリル：THF (15:76.5:8.5) とし、流速は0.5 ml/min, そして試料液の供試量は20 μ l とした。また、クロロフィル a および b は440 nm の波長で検出した。

結果と考察

1. 培養と活性物質の確認

本菌株は V 8 培地を用いてジャーファーメンターで培養を行い、活性物質生産の経時変化は図 1 にまとめた。菌の増殖は培養3~4日目から始まり、9日目付近で最大に達した。また、培養物の pH は菌の増殖に伴って pH 6 から7へとゆるやかに上昇した。活性物質は後述の方法で生成した時の活性物質の重量として表した。本培養条件での活性物質の生産は菌の増殖にほぼ並行しており、培養9日目付近で最大となった。これらの結果より、本菌株の最適培養日数を9日間とした。

培養濾液の酢酸エチル抽出物を試料として、酢酸エチル-クロロホルム (1:1 v/v) を展開溶媒系とした分取シリカゲル TLC (メルク No.5715) を行った。展開後の TLC プレートは UV 吸収帯および10%硫酸による発色帯を指標としてかきとりを行い、それぞれの画分を酢酸エチル抽出することにより分取するとともに、それぞれのイネラミナジョイント屈曲活性を検定したところ、画分6 (Rf 0.45 付近) に活性成分が存在することが解り、この物質を2489物質と仮称した。

活性物質の存在が明らかになったので、培養濾液と培養菌体とに含まれる活性物質の量を比較検討した。培養菌体はいったん60%アセトン水で抽出し、抽出物のアセトンを留去した後に再度

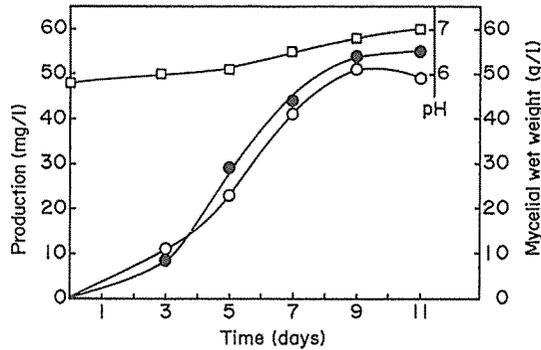


Fig. 1 Time Courses of Cultivation of *Penicillium* sp. No.2489.
 (○) Production of 2489, (●) Growth and (□) pH

酢酸エチル抽出を行って試料とした。両者の比較は上述の TLC かきとり法により行ったところ、本活性物質は約 5:1 の割合で菌体中に多く存在することが解った。

以上の結果に基づいて、2489 物質の単離精製は本菌株の培養菌体からの抽出物を粗試料として行った。

2. 2489 物質の単離精製

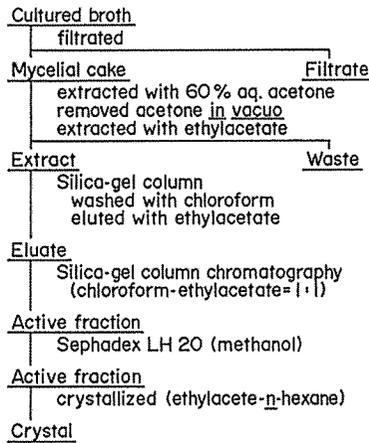


Fig. 2 Summary of Purification of 2489.

15 l の培養物から菌体を濾別して、60%アセトン水に浸漬して抽出し、アセトンを留去した水溶液より酢酸エチル抽出を行って、粗試料を得た。粗試料の精製過程は図 2 にまとめた。粗試料はジャーフェンターでの培養に消泡剤として用いたシリコンオイルを含んでいたもので、まず、シリカゲル(ワコーゲル C 100)カラムを用いるクロマトグラフィーを行った。粗試料をカラム(ク

クロロホルム) に吸着させた後にカラムをクロロホルムで洗浄してシリコンオイルを除去した後、2489 物質を酢酸エチルで溶出させた。この画分を濃縮した後に、クロロホルム-酢酸エチル (1:1 v/v) を展開溶媒としたシリカゲル(マリンクロット, 100 メッシュ)カラムクロマトグラフィーを行った。2489 物質の主画分を集めて濃縮した後に、メタノールを展開溶媒としてセファデックス LH 20 によるゲル濾過を行った。最後に、2489 物質は酢酸エチル溶液として *n*-ヘキサンを加えて結晶化を行い、培養物 1 l 分の菌体当り約 40 mg の結晶を得た。

3. 2489 物質の構造解析

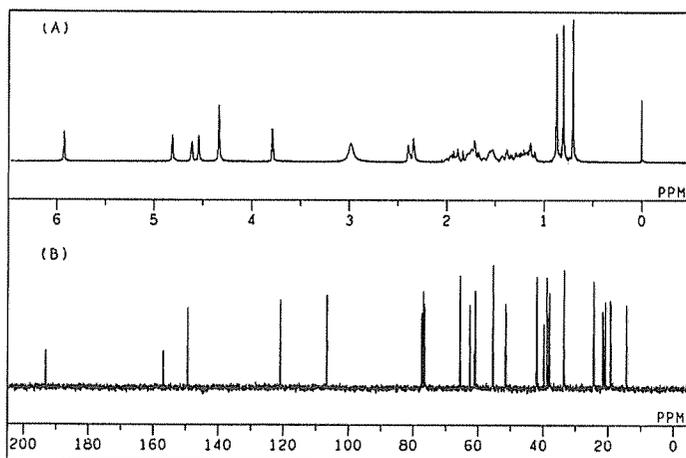


Fig. 3 ¹H- and ¹³C-NMR Spectrum of 2489 (in chloroform-*d*₁).
(A) ¹H-NMR spectrum and (B) ¹³C-NMR spectrum

¹H-NMR および ¹³C-NMR の測定結果は図 3 の (A) および (B) に、そして INEPT 法および H/C-COSY の測定結果を考慮した各シグナル帰属は表 I にまとめた。これらの結果より、本物質は炭素数 22 の化合物であると推測した。また、本物質はその構造中にケトン基を 1 個もち、エキソメチレン 1 個と二重結合 1 個を含むと考えた。

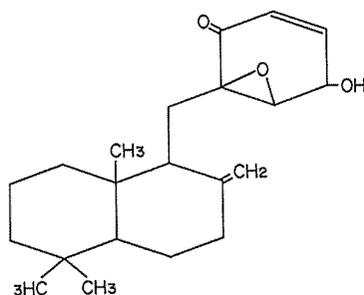


Fig. 4 Chemical Structure of 2489 (Macrophorin A).

Table 1 Summary of NMR Spectral Data of 2489.

No.	¹³ C-NMR		¹ H-NMR		Assignment	
1	14.3	q	0.70	s	-CH ₃	
2	19.2	t	1.54	m	-CH ₂ -	
3	20.8	t	1.88	dd(<i>J</i> =14.0, 11.5)	2.36 d(<i>J</i> =14.0)	-CH ₂ -
4	21.5	q	0.80			-CH ₃
5	24.3	t	1.31	dd(<i>J</i> =12.5, 4.5)	1.73 dd(<i>J</i> =12.5, 4.5)	-CH ₂
6	33.4	q	0.87	s		-CH ₃
7	33.5	s				>C<
8	38.0	t	1.98	dd(<i>J</i> =12.5, 5.0)	2.35 dd(<i>J</i> =12.5, 2.5)	-CH ₂ -
9	38.7	t	1.22	dd(<i>J</i> =12.5, 4.5)	1.76 dd(<i>J</i> =12.5, 4.5)	-CH ₂ -
10	39.6	s				>C<
11	41.9	t	1.19	dd(<i>J</i> =12.5, 4.5)	1.40 dt(<i>J</i> =12.5, 2.5)	-CH ₂ -
12	51.4	d	1.69	d(<i>J</i> =12.5)		>CH-
13	55.4	d	1.12	dd(<i>J</i> =12.5, 2.5)		>CH-
14	60.8	d	3.79	d(<i>J</i> =3.0)		>CH-O
15	61.0	s				>C-O
16	62.4	t	4.33			-CH ₂ -O
17	65.4	d	4.61	dd(<i>J</i> =2.5, 1.0)		>CH-O
18	106.6	t	4.54	m	4.81 d(<i>J</i> =1.0)	=H ₂
19	120.8	d	5.93	dd(<i>J</i> =2.5, 1.0)		=CH-
20	149.2	s				=C<
21	156.7	s				=C<
22	193.1	s				>C=O
	(ppm)		(ppm)	(Hz)	(ppm)	(Hz)

2489 物質は低分解能条件での質量分析を測定したところ、*m/z* 360 に M⁺ ピークが認められたことから、本物質の分子量は 360 であると考えた。また、高分解能条件下での測定により *m/z* 360.2824 が観測され、本化合物の分子式 C₂₂H₃₂O₄ (理論値 360.2924) が考えられる。

これらの分析結果に加えて、H/H-COSY の測定結果より構築した部分構造に基づいて本物質の化学構造を検討したところ、2489 物質はマクロフォルリン A (以下 MCA と略す) と同定された (図 4)。なお、2489 物質の各種機器分析の結果は MCA の文献値 (Sassa & Yoshikoshi 1983) とよく一致していた。

4. 2489 物質の各種植物試験

(1) イネラミナジョイント試験

イネラミナジョイント試験を行った結果は図 5 にまとめた。薬剤無添加の対照の屈曲角度は 75 度、そしてポジティブコントロールとして用いた IAA (100 ppm) では 113 度であったときに、2489 物質は 25 ppm 付近で 110 度の屈曲を示した。また、屈曲活性の様相は 25 ppm 付近を最大とするピークとなっていた。この結果より、2489 物質は IAA よりやや強い活性をもつ物質であることが明らかになった。

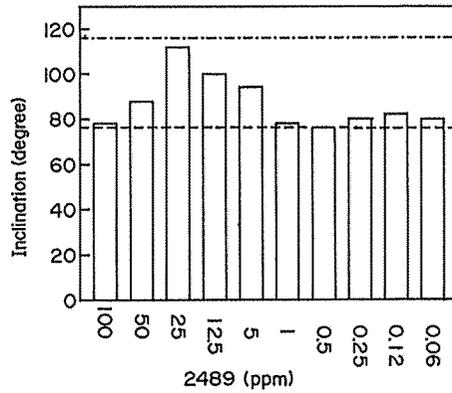


Fig. 5 Effect of 2489 on Rice Lamina Inclination Test.
 (---) Control and (· · ·) IAA (100 ppm) as a positive control

(2) カラシナ幼根部伸長試験

カラシナ幼根部伸長試験の結果は図6にまとめた。対照の根の伸長は7.5 mm であるときにポジティブコントロールの IAA では高濃度領域で根の伸長阻害がみられ、一般的な知見に一致した。これに対して、2489 物質では IAA のような阻害作用は認められなかった。

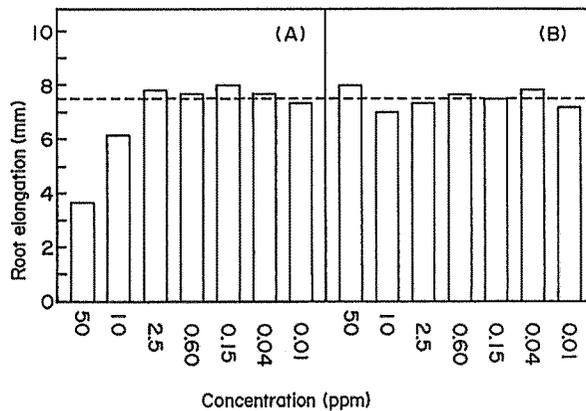


Fig. 6 Effect of 2489 on Gress Seedling Root Elongation Test.
 (A) IAA as a positive control, (B) 2489 and (---) Control

(3) インゲン第二節間伸長試験

インゲン第二節間伸長試験を行った結果は図7にまとめた。対照での伸長は22 mmであった。ジベレリン A₃ (以下 GA₃ と略す) は62 ppm 付近を最大(90 mm)として伸長を促進したが、2489 物質では全く促進がみられなかった。

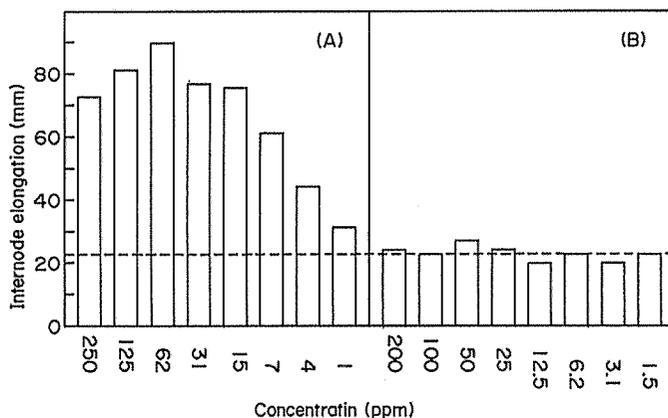


Fig. 7 Effect of 2489 on Bean Second Internode Elongation Test. (A) Gibberelic acid A3, (B) 2489 and (---) Control

(4) ダイコン下胚軸および子葉柄伸長試験

ダイコン下胚軸および子葉柄の伸長に対する GA_3 の影響を検討した結果は図 8 にまとめた。下胚軸では GA_3 の影響はあまりみられなかったが、内子葉柄および外子葉柄においては伸長促進作用が認められた。これに対して 2489 物質では、下胚軸および子葉柄の伸長はいずれもが影響を受けておらず、また子葉の外周縁に若干の黄化がみられた。

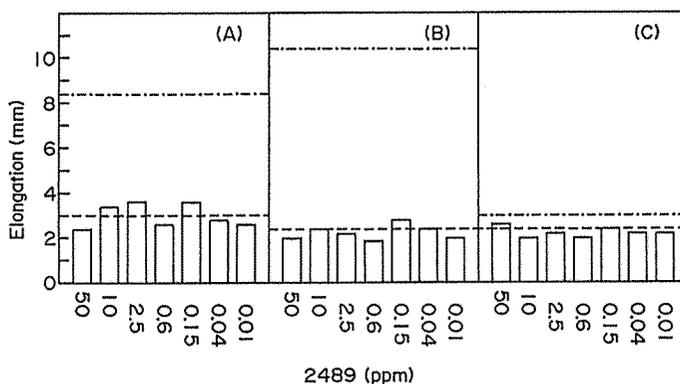


Fig. 8 Effect of 2489 on Radish Hypocotyl and Stems in Cotyledon Elongation Test (A) Inner stem, (B) outer stem, and (C) hypocotyl (---) control and (---) Gibberelic acid A 3 as a positive control

(5) キウリ子葉拡大試験

キウリ子葉拡大試験の結果は図 9 にまとめた。ポジティブコントロールとして用いた 6-ベンジルアミノプリン (以下 6 BA と略す) では 7 ppm 付近を最大とする子葉拡大促進活性を示した。この結果は一般的な知見と同様である。これに対して、2489 物質ではいずれの濃度でも子葉の拡大は認められなかった。

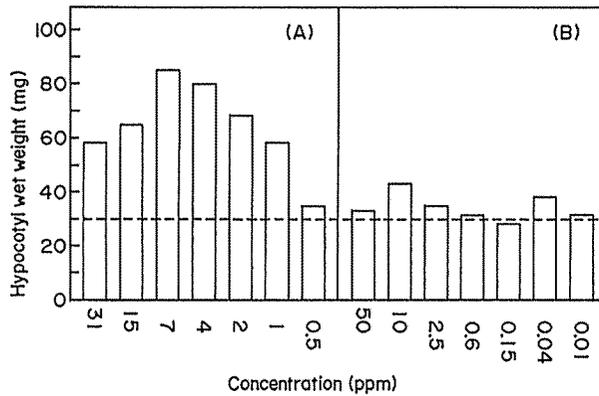


Fig. 9 Effect of 2489 on Cucurbit Etiolated Hypocotyl Expansion Test.
(A) 6-Benzylaminopurin as a positive control and (B) 2489
(---) Control

(6) キウリ子葉クロロフィル生成試験

キウリ子葉によるクロロフィル生成試験の結果は図 10 にまとめた。クロロフィル生成量は薬剤無添加の対照で 1.6 ppm, そしてポジティブコントロール (6 BA 5 ppm) の 2.6 ppm と比べて, 2489 物質は 0.04 ppm 以上の濃度で 6 BA よりも強いクロロフィル生成促進作用を示し, 0.7 ppm 付近で対照の 2 倍程度の促進がみられた。また, 2489 物質はいずれの濃度においてもクロロフィル a と b との促進活性の間に大きな差を示さなかった。また, 本物質の 50 ppm 濃度において, 検定後の子葉切片に黄化がみられた。

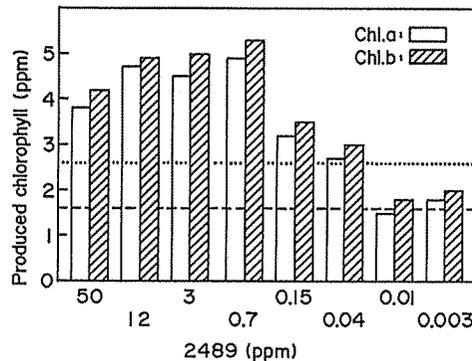


Fig. 10 Effect of 2489 on Chlorophyll Formation in Etiolated Cucurbit Cotyledon.
(---) Control and (····) Positive control with 6BA

5. まとめ

以上述べたように, 2489 物質は種々植物試験法によりオーキシン活性, ジベレリン活性およびサイトカイニン活性を検定した中で, イネラミナジョイント試験 (オーキシン様活性) およびキウリ子葉クロロフィル生成試験 (サイトカイニン様活性) の 2 種類の植物試験においてのみ活性

を示した。また、本物質の両試験に対する活性の様相がピーク状を呈することから本物質は植物ホルモン様活性をもつ物質である可能性が考えられた。また、本物質はいくつかの試験において 50 ppm 以上の濃度で子葉の黄化を引き起こした。

マクロフォリン A (MCA) はリング輪紋病菌が生産する一連のファイトトキシン (Sassa 1983, Sassa & Onuma 1983) のひとつとして単離されており、他にマクロフォリン B, C および D などの類縁化合物がある (Sassa & Yoshikoshi 1983, Sassa & Nukina 1984)。MCA は *Staphylococcus aureus* に対する MIC が 25 ppm であること、マウス癌細胞 (L-5187 Y) に対する IC₅₀ が 0.3 ppm と動物細胞に対する毒性が非常に高いと報告されているが、植物に対する作用は知られていない。

筆者らは 2489 物質の種々植物に対する作用について検討した結果、イネラミナジョイント試験においてインドール-3-酢酸 (IAA) よりやや強い活性を示すが、他のオーキシン活性試験には反応しないことを明らかにした。また、本物質は、キウリ子葉を用いたクロロフィル形成試験において、ポジティブコントロールとして用いた 6-ベンジルアミノプリン (6 BA) よりも強い活性を示すことが解った。本物質は動物細胞に対して強い細胞毒性を示すことがすでに知られていたが、本研究により植物に対して上述のようなホルモン様活性をもつことが明らかになった。また、本物質は比較的高濃度では植物に対しても毒性を示すことが解った。筆者らは 2489 物質 (マクロフォリン A) が示すこれらの作用や相互の関連性について非常に興味をもっており、現在作用メカニズムについては検討しているところである。

摘 要

筆者らは土壌より分離した糸状菌を対象として植物成長調節活性物質の検索を行っている。その中で、*Penicillium* sp. No. 2489-11 の培養濾液が黄化キウリ子葉を用いてクロロフィル生成促進試験に対して活性を示すことを見いだした。

活性物質 (2489 物質) は本菌株の培養菌体のアセトン抽出物から単離精製し、最終的に結晶として得た。2489 物質は NMR および質量分析による構造解析の結果より、細胞毒性を示す物質のひとつであるマクロフォリン A と同定した。2489 物質の植物に対する毒性あるいはホルモン様活性は知られていない。

本物質は種々植物を対象とし、オーキシン様活性試験としてイネラミナジョイント屈曲試験およびカラシナ幼根伸長試験を、ジベレリン様活性試験としてインゲン第二節間伸長試験およびダイコン下胚軸伸長試験を、そしてサイトカイニン様活性試験として黄化キウリ子葉拡大試験および黄化キウリ子葉クロロフィル生成試験をそれぞれ行った。

これらの試験の中で、黄化キウリ子葉を用いてのクロロフィル生成試験において、2489 物質はポジティブコントロールとして用いた 6 BA の活性の約 2 倍クロロフィル生成を促進することが解った。また、本物質はイネラミナジョイント試験において、ポジティブコントロールとして用いた IAA よりもわずかに強い屈曲活性を示すことも解った。しかし、本物質はその他の植物試験に対してはまったく活性を示さなかった。

これらの結果より、筆者らは 2489 物質が今までに報告されていたような動物細胞に対する毒性

とは別に、植物に対してはホルモン様活性をも有することを明らかにした。

引用文献

- Sassa, T. 1983. Structure and Absolute Configuration of Macrophoma Fruit Rot Toxin A. *Agric. Biol. Chem.* 47:1417-1418
- Sassa, T and H. Yoshikoshi. 1983. New Terpene-linked Cyclohexenone Epoxides, Macrophorin A, B and C, Produced by the Fungus Caused *Macrophoma* Fruit Rot of Apple. *Agric. Biol. Chem.* 47:187-189
- Sassa, T and Y. Onuma. 1983. Isolation and Identification of Fruit Rot Toxins from the Fungus-caused *Macrophoma* Fruit Rot of Apple. *Agric. Biol. Chem.* 47:1155-1157
- Sassa, T and M. Nukina. 1984. Macrophorin D, a new Self-growth Inhibitor of the Causal Fungus of *Macrophoma* Fruit Rot of Apple. *Agric. Biol. Chem.* 48:1923-1925
- 東岸和明, 石山忠之, 沖本陽一郎. 1991. 糸状菌が生産するイネラミナジョイントの屈曲を阻害する物質, 玉川大学農学部研究報告, 31:71-84

Summary

Chlorophyll Stimulating Substance Produced by *Penicillium* sp. No. 2489-11. Kazuaki Higashi, Tadayuki Ishiyama and Yoichiro Okimoto (Fac. Agric., Tamagawa Univ, Machida-shi, Tokyo 194) *Bull. Fac., Agric., Tamagawa Univ.* No. 32: 51-62.

In the course of our screening program to search novel plant growth regulators, a stimulative activity on chlorophyll formation in etiolated cucumber cotyledon was found in the fermented broth of our isolated strain of *Penicillium* sp. No. 2489-11.

The active substance 2489 was obtained as a crystal form by the purification with several chromatographic methods from its mycelial extract. The purified 2489 substance was identified with a fungal cytotoxic substance of Macrophorin A by the characterization and the structural elucidation with NMR and MS spectral data. Although, there are no evidences concerning its plant toxicity or plant hormonal activity yet. Accordingly, we have performed following tests for plant regulative activity of 2489 substance; such as rice-lamina inclination and cress root elongation for auxin-like activity, bean internode elongation, radish hypocotyl elongation and radish stem elongation for gibberellin-like activity, and cucumber cotyledon expansion and chlorophyll formation in etiolated cucumber cotyledon for cytokinin-like activity, respectively.

From these results of above tests, it is interesting that the stimulative activity was observed in chlorophyll accumulation in etiolated cucumber cotyledon by the treatment with

the substance 2489, in two times stimulation compared with those of the positive control of 6 BA. And also showed promotive activity in rice-lamina inclination test in slightly stronger than the positive control of IAA. Although, almost no effects were observed in the other performed assay systems.