

植物病原菌に対する抗菌物質を生産する

微生物の利用に関する研究 第4報

Streptomyces albus C 1-2 株の生産する

新抗菌物質, Imotacidin について

井上忠男・岡本康博*・西門義一

筆者らは本研究の第2報(1956)で、約1,000株の放線菌分離の中から、agar disk 変法、土壌対抗法などの選出段階を通じて、土壌伝染性植物病原菌に対する有効な菌株を探索した。そして、*Streptomyces* sp. B 12-2 と C 1-2 の2菌株(これら菌株は本報で *Streptomyces albus* の変種と同定された)が、無殺菌自然土壌を用いたガラス室試験で、*Corticium centrifugum* によるササゲの白絹病の抑制に有効であつたことを報告した。また、第3報(1956)では、*Streptomyces albus* C 1-2 株の *C. centrifugum* および *Rhizoctonia solani* に対する対抗作用に影響する種々の土壌条件を、殺菌土を用いた土壌対抗法で調べた。

これら土壌中でみられる対抗現象に抗菌物質が関与しているかどうかを知るために、*Streptomyces albus* B 12-2 と C 1-2 株の土一麴培養を、水、メタノールあるいはアセトンで抽出し、抽出液の抗菌性を調べたところ、これら菌株の液体培養の場合と同様な抗菌性が認められた。さらに、これら抽出液の抗菌力価の示すところによれば、土中の抗菌物質濃度は相当に高いことが推測された(この点については、つぎの第5報に詳述する)。このことから、土壌対抗法や、無殺菌土を用いたガラス室試験での、*C. centrifugum* あるいは *R. solani* に対する抑制効果を分析するには、この抗菌物質を除外して考えるわけにゆかないので、この物質の抽出精製を試みた。ここに得られた物質は、理化学性、抗菌性などの特質からみて、既知の物質とは明らかに異なる新物質であるので、Imotacidin と命名して報告する。*Streptomyces albus* B 12-2 および C 1-2 のどちらの菌株も Imotacidin を生産するが、C 1-2 株の方が培養液中での生産量が多いので、実験には主に C 1-2 株を用いた。

1. *Streptomyces albus* B 12-2 および C 1-2 株の性状

Streptomyces albus B 12-2 および C 1-2 株は、それぞれ、1955年岡山県倉敷市および玉島市で採取した畑土から分離した。第2報に示した agar disk 変法、土壌対抗法など一連の選出段階を経て選出し、さらに無殺菌の畑土を用いたガラス室試験で、白絹病菌 *Corticium centrifugum* に有効な対抗菌として報告したものである。第1表に両菌株の各種培地上での性状、その他の特徴を *Streptomyces albus* の記載と比較して示す。多くの培地上で両菌株の性状はよく似てほとんど区別できないが、potato sucrose agar (pH 7.0—7.2) 上での生

* 現在岡山県農業講習所

第 1 表 *Streptomyces albus* B 12-2 および C 1-2 株の培養上の性質

	<i>Streptomyces albus</i> C 1-2			<i>Streptomyces albus</i> B 12-2			<i>Streptomyces albus</i> (Type strain)
	培地内生育	気菌糸	色素生産	培地内生育	気菌糸	色素生産	
Starch agar	良, 無色	多 Mouse Gray → Black	Hydrolysis: 8 mm	同	同	Hydrolysis: 13 mm	White aerial mycelium covering the whole surface.
Czapek's agar	無	±		同	同		Colonies of medium size; the center only is covered with a white aerial mycelium. (Glucose agar) Gray aerial mycelium becoming brownish.
Ca-malate agar	可良, 無色	少, White → Pale Smoke Gray		同	同		
Glucose asparagin agar	良好, 無色 → リーム色	豊富, 厚, White → Mouse Gray		同	豊富, 厚 Varley's Gray		
Nutrient agar	良, 多量, クリーム色	±		同	同		
Potato sucrose agar	良好, 多量, 無色	豊富, 厚, White → Mouse Gray 微紅紫色		可良, コロニーは拡がらない	かなり多, White-Mouse Gray		
Plain agar	わずかに生育, 無色	±		同	同		No aerial mycelium, but a chalky white deposit forms on old colonies.
Egg albumen agar	不良, 無色	少, Lilac Gray		同	少, White → Lilac Drab		
Tyrosin agar	クリーム色	少, White	Tyrosinase: -	同	同		
Potato plug	良好, クリーム色, 隆起	豊富, White → Mouse Gray		同	かなり多, White → Pale Mouse Gray		White aerial mycelium. Growth folded, cream-colored.
Carrot plug	良, クリーム色	豊富, 白色		同	少, White-Pale Olive Gray		Excellent growth.
Glucose broth	管壁に輪状の多量沈下体は沈下形成	多量コロニー, 後菌液面に被膜状に生育胞子をかなり形成		同			(Broth) Flaky growth on bottom with surface pellicle in old cultures. White aerial mycelium.
Starch solution	液面に無色の小コロニー			同			
Czapek's solution	液化, 菌体は沈澱			同			
Gelatin (20°C)	凝固, 微アルカリになる, 菌体は被膜状			同			Rapid liquefaction. Gray colonies. No soluble pigment.
Milk				同			Rapidly peptonized after coagulation. Reaction becomes alkaline. Cream colored surface ring. White aerial mycelium.
硝酸塩還元	-			同			+
気菌糸	短かい, spiral を形成			同			

生育適温は両菌とも 30—33°C, 培養はすべて 33°C

育の様子が異なり、両者は互に変種と考えられる。また、*Streptomyces albus* の記載に比較すれば、milk 培地での特徴、硝酸塩還元能などの点で完全に一致はしないが、他の性状からみて *Streptomyces albus* と認めてよいと思われた。第2表に両菌株の cross streak method による抗菌像を示すが、両菌ともよく似た抗菌性を持ち、グラム陽性細菌および酵母、糸状菌の生育を抑制した。

第2表 Cross streak による抗菌性

試 験 菌	<i>Streptomyces albus</i>		試 験 菌	<i>Streptomyces albus</i>	
	B 12-2	C 1-2		B 12-2	C 1-2
<i>B. subtilis</i> PCI 219	16.5	8.5	<i>A. kikuchiana</i>	19.0	19.0
<i>S. aureus</i> TERAJIMA	15.0	7.0	<i>A. Oryzae</i>	10.0	7.5
<i>E. coli communior</i>	0	0	<i>B. cinerea</i>	22.0	24.0
<i>E. aroidae</i>	0	0	<i>C. lindemuthianum</i>	10.0	10.5
<i>P. tabaci</i>	0	0	<i>F. niveum</i>	14.0	14.0
<i>S. sake</i>	19.0	18.0	<i>O. miyabeanus</i>	23.5	23.0
<i>C. albicans</i>	19.5	18.0	<i>P. oryzae</i> P 2	24.0	26.0
			<i>R. nigricans</i>	8.0	7.0

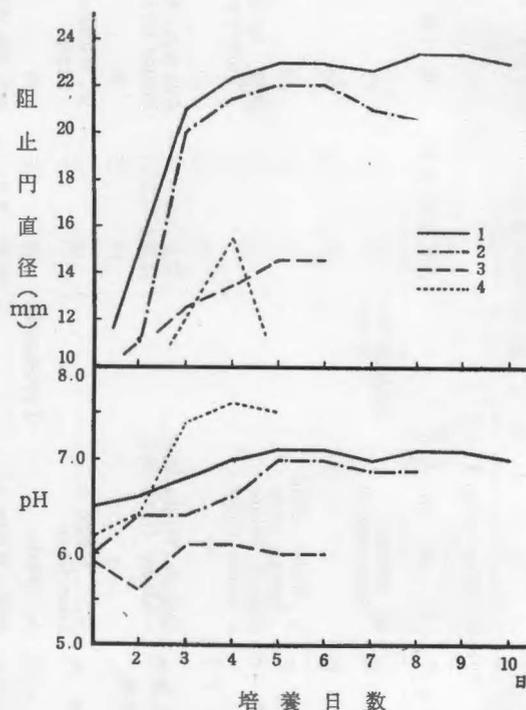
細菌類：30°C 48 hr.

S. sake, *C. albicans*：27°C 48 hr.

糸状菌：27°C 72 hr.

2. Imotycin の生産

Streptomyces albus B 12-2 および C 1-2 両菌株の生産する抗菌物質は、後述するように、まったく同じ summarized papergram をあらわし、両菌株は同じ物質を生産するものと考えられたので、実験には抗菌物質生産能の高い C 1-2 株を用いた。Glucose broth, Czapek's solution, starch solution などの培地では Imotycin 生産量は少なく、麩、馬鈴薯、大豆粉など植物質を含む培地の方が適当であった。麩または大豆粉 3% を基本成分にし、蔗糖、グルコース、グリセリン、澱粉などを炭素原に用い、さらに、 K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, 肉エキス、ペプトン、イーストなどを加えた種々の培地を用いて比較したが、麩 3%、蔗糖 2%、 K_2HPO_4 0.1% の組成の培地がもつともよかつた。また、この組成の培地に、それぞれ 0.25% の肉エキス、ペ

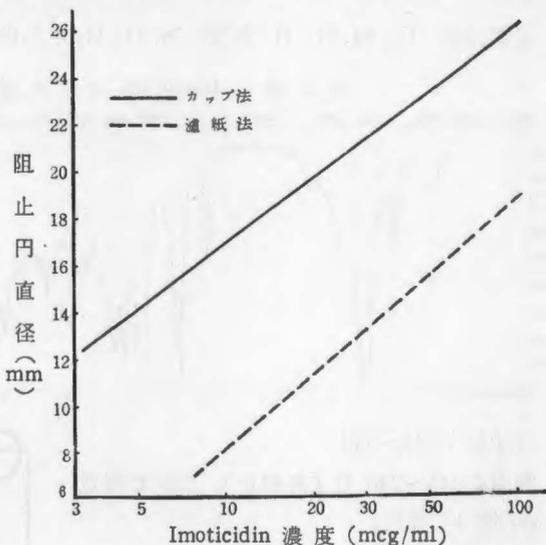


第1図 Imotycin の生産

- 1: 麩 3%, 蔗糖 2%, K_2HPO_4 0.1%
- 2: 1+肉エキス 0.25%
- 3: 1+ペプトン 0.25%
- 4: 1+イースト 0.25%

トシ、イースト、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 を加えた場合、第1図に示すように、これらN原は Imotycin 生産には不適當であつた。そこで、以後の培養には麩3%、蔗糖2%、 K_2HPO_4 0.1%の培地を用いた。28°C前後で振盪培養すると、第1図でわかるように、6、7日目頃から培養液の力価は最高に近くなり、10日目頃まで力価に大きな変動はなかつた。

Imotycin の定量には、*Bacillus subtilis* PCI 219 を試験菌に、フイヨン寒天を検定培地にい用い、カップ法および濾紙法を常法どおりに行つた。培養液の力価を調べる場合、阻止円が二重にあらわれるが、測定はすべて内側の阻止円の直径について行なつた。30°Cで20~24時間培養後に阻止円を測つたが、このとき外側の阻止円の直径は、約2mmだけ内側のものより大きかつた。第2図に精製 Imotycin を用いた場合の、Imotycin 濃度と阻止円の大きさの關係を示した。

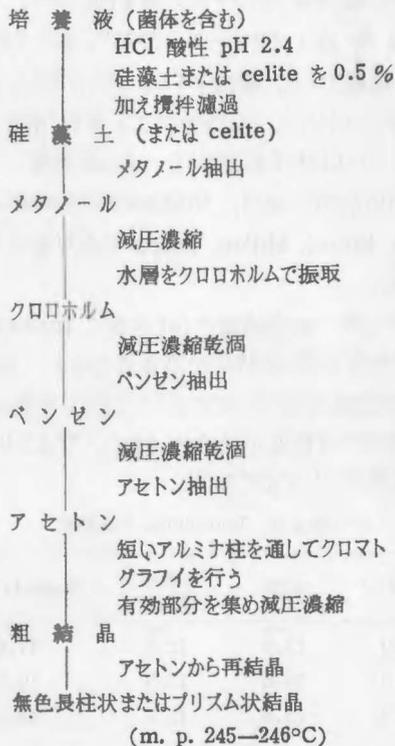


第2図 Imotycin 濃度と阻止円の大きさ

3. Imotycin の抽出精製

Imotycin は *Streptomyces albus* B 12-2 および C 1-2 両菌株の培養濾液および菌体のどちらにも含まれる。培養濾液中の有効成分は、活性炭、活性白土、サイツ濾紙などによく吸着されるが、溶出が困難である。培養濾液からブタノール、ベンゼンその他の有機溶剤で抽出できるが、筆者らは次のような方法で抽出精製を行つた。

培養7~10日の培養液を菌体も一緒に集め、濃塩酸で pH 2.4 前後にして、有効成分を沈澱させる。硅藻土または celite を培養液の約0.5%の割に加えて、約30分攪拌した後濾過する。菌体および有効成分の沈澱を吸着した濾過助剤を、原培養の1/10量のメタノールで数回にわけて抽出。その後、第3図に示すように、クロロホルム、ベンゼンおよびアセトンで抽出。有効成分のアセトン溶液を、アセトンでしめらせた短いアルミナ柱に注いだ後、アセトンで展開溶出す



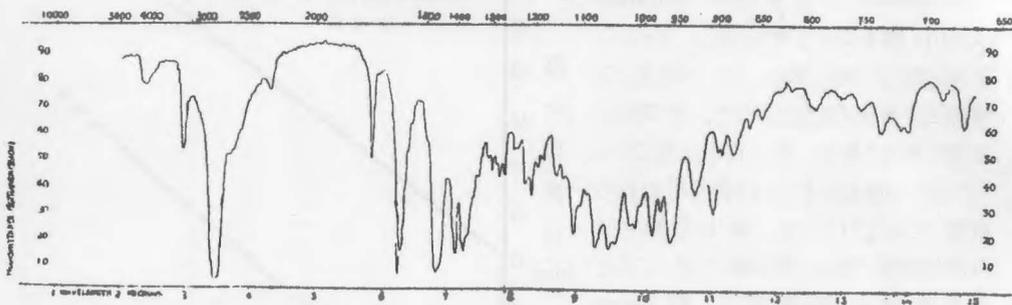
第3図 Imotycin の抽出精製法

る。溶出液の有効部分を集めて濃縮し、Imotigidin の粗結晶が得られる。アセトンから再結晶をくり返し、長柱状またはプリズム状の無色結晶が得られる。

4. Imotigidin の理化学性

元素分析：C；64.71；H；9.50；N，O；H₂O，7.63；灰分，3.16；S，0；ハロゲン，0。

第 4 図 Imotigidin の赤外線吸収スペクトル



分子量：534～553。

融点：245～246°C（無補正），225°C 附近から徐々に変色。

紫外線吸収スペクトル：紫外外部吸収はない。

赤外線吸収スペクトル：第 4 図に示す。

溶解性：メタノール，エタノール，ブタノール，醋酸エチル，醋酸アミル，クロロホルムなどに易溶，アセトン，ベンゼン，エーテルに溶け，石油エーテルにわずかに溶ける。水には不溶。

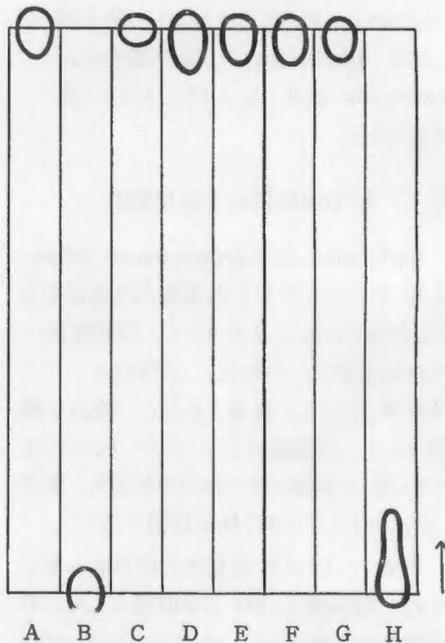
呈色反応：坂口，Ninhydrin，Xanthoprotein，Biuret，Millon，Tollen の各反応はすべて陰性。

安定性：培養濾液の pH を変え Imotigidin の耐熱性を調べた結果を第 3 表に示す。加熱しなければ酸性側でも安定であったが，加熱すれば酸性側で或程度不活性化された。アルカリ性では加熱しても安定であった。

第 3 表 Imotigidin の耐熱性

pH	室温	100°C 10分	Autoclaved
5.0	13.0	12.3	11.0
7.0	13.0	13.5	12.5
9.4	13.3	13.5	13.0

培養濾液 paper disk method



第 5 図 Imotigidin の Summarized Papergram

- A: Wet Butanol C: 80% Phenol
 B: 3% NH₄Cl D: 50% Acetone
 E: Butanol, Methanol, Water, Methyl orange (40ml, 10ml, 20ml, 1.5g)
 F: Butanol, Methanol, water (40, 10, 20)
 G: Benzen, Methanol, (80, 20)
 H: Distilled water

第 4 表 Imticipin の 抗 菌 ス ペ ク ト ル

試 験 菌	最低有効阻止濃度 (mcg/ml)	
	24 hr.	48 hr.
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	0.1—0.5	0.1—0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0.1—0.5	0.1—0.5
<i>Erwinia aroidea</i>	>100	>100
<i>E. carotovora</i>	>100	>100
<i>Escherichia coli communior</i>	>100	>100
<i>Pseudomonas tabaci</i>	>100	>100
<i>Xanthomonas oryzae</i>		30—50
<i>Saccharomyces sake</i>	5—10	5—10
<i>Tolura utilis</i>	5—10	5—10
<i>Candida albicans</i>	10—50	50—100
	48 hr.	5 days
<i>Alternaria kikuchiana</i>	1—5	20—30
<i>Aspergillus niger</i>	50—100(20)	>100(20)
<i>A. oryzae</i>	75—100	>100
<i>Botrytis bassiana</i>	>100(10)	>100
<i>B. cinerea</i>	5—10(1)	5—10(1)
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	5—10(5)	50—100(5)
<i>Corticium centrifugum</i>	>100(1)	>100(1)
<i>C. sasakii</i>	75—100(3)	>100(3)
<i>Fusarium bulbigenum</i> var. <i>nelumbicolum</i>	>100(1)	>100(1)
<i>F. caeruleum</i>	>100	>100
<i>F. lini</i>	75—100(10)	>100(20)
<i>F. oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i>	>100	>100
<i>F. niveum</i>	>100(5)	>100
<i>Gibberella Fujikuroi</i>	>100	>100
<i>G. zeae</i>	30—50(20)	50—100(20)
<i>Gloeosporium nelumbii</i>	75—100(25)	>100
<i>Helminthosporium sativum</i>	5—10(1)	5—10(1)
<i>Oospora destructor</i>	75—100(50)	>100
<i>Ophyobolus miyabeanus</i>	30—50(5)	>100(20)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	50—100(10)	50—100(10)
<i>P. glaucum</i>	25—50(15)	>100(20)
<i>Piricularia oryzae</i> P2	0.5	0.5—1.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	>100(10)	>100(10)
<i>Rhizopus nigricans</i>	20—30(10)	20—30(10)
<i>Rosellinia necatrix</i>	5—10(1)	10—15(3)
<i>Sclerotinia libertiana</i>	10—15(1)	10—15(1)
<i>S. minor</i>	25—50(1)	50—75(1)
<i>Thielavia basicola</i>	>100(10)	>100
<i>Trichoderma</i> sp.	>100(10)	>100(25)
<i>Trichophyton interdigitale</i>	25—50(10)	>100

() 内の数字は試験菌の生育阻害最低濃度

Summarized papergram: 第5図に精製した Imotycin の summarized papergram を示した。 *Streptomyces albus* C 1-2, B 12-2 のどちらの培養液を調べても、これと同じ papergram が得られた。

5. Imotycin の 抗 菌 性

Cross streak method による抗菌性は前に示したので、ここには精製 Imotycin の抗菌性を述べる。検定培地として細菌には glucose meat peptone agar を、酵母および *Candida* には pH 7.0—7.2 の potato sucrose agar を、糸状菌には pH 5.4 の potato sucrose agar を用いた。70%アセトンの少量に溶解した Imotycin を、pH 7.2 の磷酸緩衝液で希釈して培地に加え、agar dilution streak method で試験菌抑制最低濃度を調べた。細菌、酵母および *Candida* は 30°C で培養し、24 および 48 時間後の発育を調べ、糸状菌は 27°C に培養して、2 および 5 日後に調べた。第4表に Imotycin の抗菌スペクトルを示す。グラム陽性の *Bacillus subtilis* PCI 219, *Staphylococcus aureus* 寺島株, *S. aureus* 209 P などは 0.1—0.5mcg/ml, 酵母類 *Saccharomyces sake*, *Tolura utilis* は 5—10mcg/ml で、また糸状菌の中、*Piricularia oryzae* P 2 は 0.5—1.0mcg/ml, *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium sativum* は 5—10mcg/ml で、それぞれ抑制された。グラム陰性細菌は 100 mcg/ml でも影響を受けなかつた。*Candida albicans* あるいは糸状菌の多くは、低濃度でも種々の程度生育に影響を受けたが、完全発育阻止には高濃度が必要であつた。Imotycin 生産菌である *Streptomyces albus* B 12-2, C1-2 両菌株が、土中で抑制した *Corticium centrifugum*, *Rhizoctonia solani* などの土壤病原菌の中で、*Sclerotinia libertiana* が 10—15mcg/ml で完全抑制された他は、いずれも完全抑制には高濃度が必要であつた。しかし、*C. centrifugum* は 1mcg/ml, *R. solani* は 10 mcg/ml の低濃度でも生育が抑制された。

Imotycin は抗菌性の他に *B. subtilis* に対して溶菌性がある。また、さらに *B. subtilis* に対しては第5表に示すように殺菌性がある。1, 5, 10, 25, 50 および 100mcg/ml の Imotycin 溶液に *B. subtilis* および *S. sake* の濃懸濁液を加え、所定時間 30°C で培養し、菌の生死を調べた。*S. sake* に対しては殺菌性を示さなかつたが、*B. subtilis* に対しては、25mcg/ml で5時間以上、50mcg/ml 以上の濃度では30分間処理すると殺菌性を示した。

第5表 Imotycin の 殺 菌 性

Imotycin 濃度 mcg/ml	<i>B. subtilis</i>					<i>S. sake</i>				
	30分	1時	5	10	24	30分	1時	5	10	24
0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
10	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
25	+	+	-	-	-	++	++	++	++	++
50	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
100	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++

培養温度 30°C

6. 既知の抗糸状菌物質と Imotycin の異同

赤外線吸収スペクトルからみて Imotycin は新物質と思われる。さらに Imotycin の幾つかの特性は既知の抗糸状菌物質とは異なる。抗酵母、抗糸状菌物質の類別には、Utahara その他 (1954) の紫外線吸収スペクトルによる分類、Yajima (1955) の summarized papergram によるものなどがある。また、住木 (1955) は紫外線吸収スペクトルその他の性質から、抗糸状菌物質生産放線菌分離株を 9 群に大別できるとしている。Imotycin 生産菌 *Streptomyces albus* B 12-2 および C 1-2 株は、Imotycin が紫外線吸収をもたぬことから、住木の分類による VIII 群の抗菌物質生産菌株である。Fukunaga その他 (1955) の Blasticidin B, C は紫外外部吸収を示さないが、summarized papergram, 抗菌スペクトル, 理化学性から、Imotycin とは明らかに異なる。Yajima によれば、Imotycin と同型の summarized papergram をもつものには、Hygroscofin (中沢その他, 1954), Mycelin (相磯, 1952), Trichonin, Ascocin 1st substance があるが、これらはいずれも紫外部に特異吸収を示し、また、*Bacillus subtilis* に抗菌性がなく、明らかに Imotycin と異なる。

Imotycin の赤外線吸収スペクトル, 元素分析, 分子量などは, 三共製薬で調べていただいた。厚く感謝の意をあらわす。

摘 要

Corticium centrifugum, *Rhizoctonia solani* など土壌伝染性植物病原菌に対し、土壌中で対抗作用を示す *Streptomyces albus* B 12-2 および C 1-2 の両株の土一麩培養から、抗菌物質が検出され、この物質が、これら対抗菌の土中での対抗作用に、何らかの役割を果しているのではないかと考えられたので、抗菌物質の抽出精製を試みた。得られた物質は、理化学性、抗菌性などからみて新物質と認められ、Imotycin と命名した。Imotycin はグラム陽性細菌、酵母および糸状菌を抑制する。とくに *B. subtilis* に対しては溶菌性および殺菌性がある。*Piricularia oryzae*, *Botrytis cinerea* などには低濃度で有効があるが、多くの糸状菌の完全生育阻止にはかなり高濃度を要する。Imotycin の抗菌性の他、Imotycin の生産条件、抽出精製法、理化学性を調べ、既知の抗菌物質との異同を明らかにした。

文 献

- 相磯和嘉, 新井正, 鷲田一博, 店網テイ. 1952. 放線菌菌体から抽出される抗糸状菌物質 "Mycelin" に就いて. *Journal Antibiotics* 5: 217—219.
- Fukunaga, K., Misato, T., Ishii, I. and Asakawa, M. 1955. Blasticidin, a new anti-phytopathogenic fungal substance. part 1. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 19: 181—188.
- 中沢鴻一, 隠岐金蔵, 田所勲, 本庄美喜男, 人見弘, 上柳次三郎. 1954. *Streptomyces* 1545 株の生産する新抗黴, 抗植物病原菌物質 Hygroscofin に就て (II). *日本農化会誌* 28: 715—716.
- 西門義一, 井上忠男, 岡本康博. 1956. 植物病原菌に対する抗菌物質を生産する微生物の利用に関する研究. 第 2 報. *農学研究* 43: 165—171.

- 西門義一, 岡本康博, 井上忠男. 1956. 植物病原菌に対する抗菌物質を生産する微生物の利用に関する研究. 第3報. 農学研究 44: 119—126.
- 住木諭介, 坂口謹一郎, 朝井勇宜. 1955. 抗ウイルス物質, 抗微生物質及び抗酵母物質の製造に関する総合研究. 昭和29年度文部省科学試験研究報告集録農学編 p. 49.
- Utahara, R., Okami, Y., Nakamura, S. and Umezawa, H. 1954. On a new antifungal substance, medicidin, and other antifungal substances of *Streptomyces* with three characteristic absorption maxima. *Journal Antibiotics* 7 (Ser. A): 120—124.
- Yajima, T. 1955. On the classification of antifungal antibiotics. *Journal Antibiotics* 8 (Ser. A): 189—195.