

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6304817号  
(P6304817)

(45) 発行日 平成30年4月4日(2018.4.4)

(24) 登録日 平成30年3月16日(2018.3.16)

(51) Int.Cl. F 1  
**AO1N 37/02 (2006.01)** AO1N 37/02  
**AO1P 3/00 (2006.01)** AO1P 3/00  
**C12P 7/62 (2006.01)** C12P 7/62  
**C12R 1/645 (2006.01)** C12R 1:645

請求項の数 2 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2014-170865 (P2014-170865)	(73) 特許権者	504150461 国立大学法人鳥取大学 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地
(22) 出願日	平成26年8月25日(2014.8.25)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(65) 公開番号	特開2016-44153 (P2016-44153A)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(43) 公開日	平成28年4月4日(2016.4.4)	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
審査請求日	平成29年3月27日(2017.3.27)	(72) 発明者	岡 久美子 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内
		(72) 発明者	尾谷 浩 鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プナシメジ培養菌体が生産する揮発性物質を含有する抗菌剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プナシメジ培養菌系体、プナシメジ培養濾液またはプナシメジ培養濾液の有機溶媒抽出物を配合することを特徴とする、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルを含有する農薬の製造方法。

【請求項2】

プナシメジを培養して菌系体または培養濾液を得て、菌系体または培養濾液を有機溶媒にて抽出し、精製することを特徴とする、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、菌類が生産する抗菌物質を用いた抗菌剤および農薬、ならびに当該抗菌物質の製造方法に関する。詳細には、本発明はプナシメジ培養菌体が生産する揮発性抗菌物質を含有する抗菌剤および農薬、ならびに当該揮発性抗菌物質の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在使用されている殺菌剤の多くは、安全性の面から選択性の高い殺菌剤が主流で抗菌スペクトラムが狭く、殺菌剤に対する耐性菌の出現などの問題も生じている。微生物が生産する抗菌物質は、すでに抗生物質として農薬や医薬等に利用されているが、そのほとん

どは非揮発性の物質である。しかし、非揮発性の抗菌物質は、作物や環境に残留し、環境汚染を引き起こす可能性があり、安全性の面から問題が多い。一方、揮発性の抗菌物質は、通気の少ない施設栽培など使用条件は限定されるものの効果が隅々まで行き渡り、通気によって揮発性抗菌物質が容易に拡散、消失することから、安全面、健康面および環境面からも優れた特徴を持つと考えられる。

【0003】

菌類(きのこ類)は自然界において、他の微生物(菌類、細菌など)と競争・拮抗して生息していることから、周囲に拡散する揮発性の抗菌物質を生産していると考えられている。きのこ類が生産する揮発性物質については、これまで医学・薬学の分野で研究が行われており、ヒトの健康増進などに関与する幾つかの生理活性物質が報告されている。抗菌作用に着目した研究としては、きのこ類により生産される揮発性抗菌物質生産を利用した病害防除の報告がある(特許文献1参照)。しかし、きのこ類が生産する揮発性抗菌物質の同定は行われていなかった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特許第5561637号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

20

本発明が解決しようとする課題は、きのこ類、特に安全性が高いと考えられる食用きのこの揮発性抗菌物質を同定し、抗菌剤や農薬として利用することであった。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ね、食用きのこであるブナシメジの揮発性抗菌物質が2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステル(あるいは1-tert-ブチル-2-メチル-1,3-プロパンジオール1-イソブチラートともいう)であると同定し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

30

したがって、本発明は以下のものを提供する：

(1) 2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルまたはその誘導体を含有する抗菌剤、

(2) 2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルまたはその誘導体を含有する農薬、および

(3) ブナシメジを培養して菌糸体を得て、菌糸体を有機溶媒にて抽出することを特徴とする、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルの製造方法。

【発明の効果】

【0008】

40

本発明によって、きのこ類が生産する抗菌物質が2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルであると同定された。この抗菌物質は、食用きのこ由来であるため、ヒトや動物に対して特に安全性が高いと考えられる。したがって、本発明によれば、ヒトや動物に対して安全性が高い抗菌剤や農薬が提供される。さらに、この抗菌物質の製造方法も提供される。この抗菌物質は揮発性であり、しかも香りが少ないので環境汚染がなく、閉鎖室内では隅々まで抗菌効果が及ぶ。この抗菌物質はきのこの栽培後の廃菌床からも得ることができるので、廃菌床の再利用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

50

【図1】図1は、きのこが生産する揮発性抗菌物質の検定法を模式的に説明した図である。

【図2】図2は、ブナシメジ由来揮発性抗菌物質の精製法を示すスキームである。

【図3】ブナシメジ由来揮発性抗菌物質のGC-MSCクロマトグラムである。

【発明を実施するための形態】

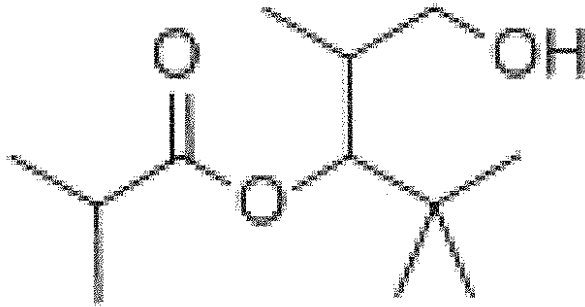
【0010】

本発明は、1の態様において、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルまたはその誘導体を含有する抗菌剤を提供する。

【0011】

本発明者らは、安全性が高いと考えられる食用きのこの揮発性抗菌物質を同定し、抗菌剤や農薬として利用することを目的として、表1に示す26種類の菌株についてスクリーニングを行った。その結果、揮発性で臭いの少ない抗菌性物質として、ブナシメジにより生産される2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルを同定した。この物質が抗菌活性を有することは全く知られていなかった。この物質の構造を以下に示す。

【化1】



【0012】

本発明において、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルの誘導体も、この物質と同様に揮発性で抗菌活性を有するものである限り、本発明に使用することができる。この物質の誘導体は、当業者が一般的な化学的手法を用いることにより得ることができる。この物質の誘導体の例としては、上式の水酸基の水素が、炭素数1~6個のアルキル基(例えばメチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基など)、炭素数1~6個のアルケニル基、炭素数1~6個のアルキニル基、アシル基(例えばアセチル基など)、アリール基(例えばフェニル基、ナフチル基など)、ヘテロアリール基、ベンジル基、ベンゾイル基などで置換された化合物が挙げられるが、これらに限定されない。これらの基は置換基を有していてもよい。

【0013】

本発明の抗菌剤中の2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルまたはその誘導体の含有量は、対象とする菌の種類、使用場所、使用目的、望まれる抗菌作用の程度などに応じて適宜変更することができる。

【0014】

本発明における2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルまたはその誘導体は、多くの種類の菌類に対して強力な抗菌効果を有する。従って、本発明の抗菌剤は、単独で幅広い用途に使用できるが、本発明の抗菌剤中に他の抗菌剤が含まれていてもよく、本発明の抗菌剤と他の抗菌剤を併用してもよい。他の抗菌剤は公知のものを適宜選択して用いることができる。

【0015】

また、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルまたはその誘導体の抗菌作用は静菌的であることがわかった。そ

10

20

30

40

50

のため、本発明の抗菌剤は、耐性菌が生じにくい、人や動物に対して安全性が高い、残留性を考慮しなくてもよい等の利点を有する。

【0016】

本発明の抗菌剤の形態は、液体、半固体、固体のいずれであってもよい。例として、スプレー剤、散布用液剤、塗布用液剤、クリーム、ゲル、ペレット、粉末などが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の抗菌剤の形態の一例として、本発明の抗菌剤が液体の場合は、濾紙などの担体に染み込ませて揮発性の有効成分が連続的に放出されるようにしてもよい。本発明の抗菌剤が液体の場合は、2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルまたはその誘導体を有機溶媒に溶解して用いることが一般的である。有機溶としてはエタノール、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、アセトン、メタノールなどが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の抗菌剤の形態が半固体または固体の場合は、適当な担体に 2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルまたはその誘導体を吸着させて用いることができる。担体は当業者に公知のものから選択することができる。

10

【0017】

本発明の抗菌剤の有効成分である 2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルまたはその誘導体は揮発性であるため、閉鎖空間で使用すると、その効果が隅々にまで及ぶので好ましい。

【0018】

本発明は、もう一つの態様において、2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルまたはその誘導体を含有する農薬を提供する。

20

【0019】

本発明の農薬は、様々な剤形とすることができる。例えば、スプレー剤、散布用液剤、塗布用液剤、クリーム、ゲル、ペレット、粉末などが挙げられるがこれらに限定されない。本発明の農薬の形態の一例として、本発明の農薬が液体の場合は、濾紙などの担体に染み込ませて揮発性の有効成分が連続的に放出されるようにしてもよい。また、2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルまたはその誘導体は揮発性なので、本発明の農薬はハウス内での使用に好適である。

30

【0020】

本発明の農薬中の 2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルまたはその誘導体の濃度は、対象とする菌の種類、対象とする植物、使用場所、使用目的、望まれる抗菌作用の程度などに応じて適宜変更することができる。

【0021】

本発明の農薬中に他の農薬成分が含まれていてもよく、本発明の抗菌剤と他の農薬成分を併用してもよい。他の農薬成分は公知のものを適宜選択して用いることができ、例えば公知の抗菌剤などが挙げられる。

【0022】

本発明の農薬は、耐性菌が生じにくい、人や動物に対して安全性が高い、残留性を考慮しなくてもよい等の利点を有する。

40

【0023】

本発明の農薬に関する他の説明としては、本発明の抗菌剤に関する説明があてはまる。

【0024】

本発明は、さらなる態様において、ブナシメジを培養して菌糸体を得て、菌糸体を有機溶媒にて抽出することを特徴とする、2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルの製造方法を提供する。2 - メチルプロパン酸 2 , 2 - ジメチル - 1 - ( 2 - ヒドロキシ - 1 - メチルエチル ) プロピルエステルは化学合成が困難であり、菌類、好ましくはブナシメジを培養してこの物質を生産さ

50

せ、菌糸体から有機溶媒を用いて抽出することが好ましい。

【0025】

ブナシメジは野生株、保存株あるいは変異株のいずれの株であってもよく、例えば鳥取大学農学部附属菌類きのご遺伝資源研究センター保存菌株であるT U F C 1 1 7 5 7株、T U F C 1 1 9 0 6株、T U F C 1 1 9 1 1株などが好ましく用いられる。

【0026】

ブナシメジの培養は、通常は液体培養であるが、木材チップや小麦フスマなどを用いる固体培養であってもよい。ブナシメジの菌糸体の培養方法は当業者に公知であり、培地組成や培養温度、pHなどの培養条件を適宜選択することができる。

【0027】

抽出に用いる有機溶媒としては、ジエチルエーテル、酢酸エチル、ブタノールなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

有機溶媒中の2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルを精製して純度を高めてもよい。精製手段および方法は公知であり、例えば、有機溶媒分配抽出法、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)などを用いることができるが、これらの手段・方法に限定されない。好ましくは、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルの精製にはクロマトグラフィーを用いる。好ましいクロマトグラフィーの例としては、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。なお、実施例において、「ブナシメジ揮発性物質」、「ブナシメジ揮発性抗菌物質」、「揮発性抗菌物質」、「抗菌性物質」などという場合は、2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステルを指すものとする。

【実施例1】

【0030】

1. ブナシメジ培養菌糸体が生産する揮発性物質の抗菌活性

<材料および方法>

(1) 供試菌および孢子調製

鳥取大学農学部附属菌類きのご遺伝資源研究センターの保有株であるブナシメジ(*Hypsizygus marmoreus*) T U F C 1 1 9 0 6 菌株を用いた。

植物病原系状菌として、ナシ黒斑病菌(*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype) O - 2 7 6 菌株、キャベツ黒すす病菌(*A. brassicicola*) O - 2 6 4 菌株、ナス灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*) A B C - 0 0 1 菌株、キュウリ炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*) C - 1 4 菌株およびトマト褐色輪紋病菌(*Corynespora cassiicola*) L C - 9 3 0 2 0 菌株の5菌株を用いた。

ブナシメジおよび植物病原菌類の菌株はすべて試験管中のジャガイモ煎汁寒天培地 [Difco<sup>TM</sup> Potato Dextrose Agar 39g/蒸留水(以下DW) 1リットル] (以下PDA培地) 上に25℃で保存し、適宜実験に使用した。

PDA培地上で生育したO-276菌株を、シャーレ(直径9cm)のV-8寒天平板培地(V-8ジュース160ml/CaCO<sub>3</sub> 3g/寒天20g/DW800ml)(以下V-8培地)上に接種し密封した後、black-light-blue(以下BLB)を照射し、20℃で2週間静置培養した。培地表面に形成された孢子を生きて取り除いた。その後、吸引濾過により、濾紙(Whatman No. 50)上に孢子を集め、室温で乾燥させた後、-80℃で保存した。濾紙上の乾燥胞

10

20

30

40

50

子を適宜実験に使用した。

孢子使用時には濾紙上の乾燥孢子を筆で掻き取りDWに懸濁させ、遠心分離（800 x g、5分）した。沈殿した孢子にDWを加え、Thoma血球計により孢子濃度をDWで調整して用いた。

PDA培地上で生育したO-264菌株をV-8培地上に接種し密封した後、25℃で2週間静置培養した。培地表面に形成された孢子をDW中に筆で掻き取って懸濁し、4重キムワイプで濾過して菌糸片を取り除いた。その後、吸引濾過により、濾紙上に孢子を集め、室温で乾燥させた後-80℃で保存した。濾紙上の乾燥孢子を適宜実験に使用した。孢子使用時には前述の方法と同様の操作を行った。

PDA培地上で生育したABC-001菌株はV-8培地上に接種し密封した後、BLBを照射し、20℃で2週間静置培養した。培養表面に形成された孢子をDW中に筆で掻き取って懸濁し、2重キムワイプで濾過して菌糸片を取り除いた。その後、遠心分離（800 x g、5分）し、沈殿した孢子をDWに再懸濁しThoma血球計により孢子濃度を調整し用いた。

PDA培地上で生育したC-14菌株を米ぬか培地（米ぬか25g / スクロース10g / 寒天10g / DW500ml）に接種し密封した。BLBを照射し、20℃で7日間静置培養した後、培養表面に形成された孢子をDW中に筆で掻き取って懸濁し、2重キムワイプで濾過して菌糸片を取り除いた。その後、遠心分離（800 x g、5分）し、沈殿した孢子をDWに再懸濁しThoma血球計により孢子濃度を調整し実験に用いた。

PDA培地上で生育したLC-93020菌株をV-8培地上に接種し密封した後、BLBを照射し、20℃で3週間静置培養した。培地表面に形成された孢子をDW中に筆で掻き取って懸濁し、4重ガーゼで濾過して菌糸片を取り除いた。その後、吸引濾過により、濾紙上に孢子を集め、室温で乾燥させた後-80℃で保存した。濾紙上の乾燥孢子を適宜実験に使用した。孢子使用時には前述の方法と同様の操作を行った。

#### 【0031】

（2）ブナシメジ培養菌糸体における揮発性物質の抗菌活性

プラスチックシャーレ（直径9cm）のPDA培地上にブナシメジTUFC11906菌株の菌糸片を置床し培養した。暗下25℃でシャーレ一面に菌糸が生育した後、シャーレを上下逆にし、ブナシメジ菌糸を上面にして、下側に以下の各検定サンプルを置いた。なお、対照区として、ブナシメジを接種していないPDA培地の入ったシャーレを用いた。

まず、各病原菌の菌糸生育に対する抗菌性を検定する場合はPDA培地上に培養しておいた植物病原菌類の菌糸をコルクボーラー（直径4mm）で打ち抜き、PDA培地を入れた小型シャーレ（直径3cm）の中央に接種した。ブナシメジを生育させたシャーレ（直径9cm）の下側に植物病原菌類を接種した蓋をしていない小型シャーレ3個を入れ、シャーレ（直径9cm）の蓋をしてパラフィルムで密封した。なお、対照区はブナシメジを接種していない培地のみシャーレに、植物病原菌類を接種したシャーレを入れた。暗下25℃で3～5日間静置し、対照区での植物病原菌類の菌糸がシャーレの8～9割に広がった時点で小型シャーレを取り出し菌糸の伸長を測定した。菌糸の伸長は次式により求めた。

$$\text{菌糸伸長 (mm)} = \text{病原菌類コロニー直径 (mm)} - \text{コルクボーラー直径 (mm)}$$

また、抑制率を次式により求めた。

$$\text{抑制率(\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{処理区コロニー直径の平均値}}{\text{対照区コロニー直径の平均値}} \right] \times 100$$

#### 【0032】

次に各病原菌の孢子発芽に対する抗菌性を検定する場合は、植物病原菌類のO-276

菌株、O - 2 6 4 菌株、A B C - 0 0 1 菌株、C - 1 4 菌株および L C - 9 3 0 2 0 菌株の孢子濃度を  $5.0 \times 10^5$  個 / m l に調整し、スライドガラス上に 1 枚につき 2 カ所、 $30 \mu\text{l}$  ずつ滴下した。きのご類を生育させたシャーレの下側にキムワイプを敷き DW で湿らせ、その上にスライドガラスを置いた。シャーレをパラフィルムで密封後、暗下 2 5、2 4 時間静置した。2 4 時間後に、スライドガラス上に滴下した孢子懸濁液にラクトフェノールコットンブルー溶液 (コットンブルー 0.05 g / フェノール 20 g / グリセロール 40 m l / 酪酸 20 m l / DW 20 m l) を少量滴下し、光学顕微鏡下で孢子の発芽数を計測し、発芽率を次式により求めた。

孢子発芽率 (%) = 総発芽孢子数 / 総孢子数  $\times 100$

また、抑制率を次式により求めた。

10

$$\text{抑制率(\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{処理区孢子発芽率の平均値}}{\text{対照区孢子発芽率の平均値}} \right) \right] \times 100$$

【 0 0 3 3 】

さらに、各病原菌による病斑形成に対する抗菌性を検定する場合は、植物病原菌類のキャベツ黒すす病菌 O - 2 6 4 菌株およびトマト褐色輪紋病菌 L C - 9 3 0 2 0 菌株を使用した。なお、供試植物としてキャベツ黒すす病菌の宿主であるキャベツ (*Brassica oleracea*) 品種：初秋とトマト褐色輪紋病菌の宿主であるトマト (*Solanum lycopersicum*) 品種：桃太郎を用いた。キャベツおよびトマトの種子をくみあいニッピ園芸培土 1 号を入れたポット (直径 9 c m) に播種し 2 5 の植物培養室 (1 4 時間明下、1 0 時間暗下) で発芽させた。キャベツおよびトマトが第 5 ~ 6 葉に展開した段階で適宜展開葉を切り取り、実験に使用した。O - 2 6 4 菌株および L C - 9 3 0 2 0 菌株の孢子濃度を  $5.0 \times 10^5$  個 / m l に調整し、O - 2 6 4 菌株はキャベツの切り取り葉の裏面に、L C - 9 3 0 2 0 菌株はトマト切り取り葉の裏面にそれぞれスプレー接種した。ブナシメジを接種したシャーレの下側にキムワイプを敷き、キムワイプの上に接種切り取り葉を各 1 枚ずつ置き、シャーレをパラフィルムで密封した。その後、暗下 2 5 で 4 8 時間静置した。切り取り葉を取り出し、病斑数を数え葉  $1 \text{ c m}^2$  あたりの病斑数を算出した。また、病斑形成抑制率を次式により求めた。

20

$$\text{抑制率(\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{処理区病斑数の平均値}}{\text{対照区病斑数の平均値}} \right) \right] \times 100$$

【 0 0 3 4 】

< 結果 >

ブナシメジ T U F C 1 1 9 0 6 菌株の培養菌系体が生産する揮発性物質は、キャベツ黒すす病菌 O - 2 6 4 菌株の菌系生育および孢子発芽に対して抑制活性を示した。さらに、O - 2 6 4 菌株による病斑形成も顕著に抑制した (表 1)。なお、この際、揮発性物質におけるキャベツ切り取り葉への障害は見られなかった。

30

【表 1】

表 1. ブナシメジ培養菌糸体が生産する揮発性物質の植物病原糸状菌に対する抗菌活性

検定病原菌 (菌株)	反復	抑制率(%)		
		菌糸生育	胞子発芽 <sup>a)</sup>	病斑形成
Alternaria alternata Japanese pear pathotype (O-276)	1	4.2	60.1	— <sup>b)</sup>
	2	22.1	52.6	—
	平均	13.2±9.0	56.4±3.8	
Alternaria brassicicola (O-264)	1	63.4	100.0	95.3
	2	67.9	98.2	97.4
	平均	65.7±2.3	99.1±0.9	96.4±1.1
Colletotrichum orbiculare (C-14)	1	6.7	75.2	—
	2	8.9	24.6	—
	平均	7.8±1.1	49.9±25.3	
Corynespora cassiicola (LC-93020)	1	0.2	9.3	17.6
	2	0.0	60.3	69.2
	平均	0.1±0.1	34.8±25.5	43.4±25.8

10

a) 胞子濃度 :  $5 \times 10^5$  個/ml    b) - : 未検定

20

【 0 0 3 5 】

## 2. ブナシメジ培養ろ液中に含まれる揮発性物質の抗菌活性

< 方法 >

ブナシメジ T U F C 1 1 9 0 6 菌株を M a l t 液体培地 ( マルトエキス ( O r i e n t a l y e a s t C O . L t d . ) 1 5 g / 寒天 2 0 g / D W 1 リットル ) ( 以下 M A 液体培地 ) 2 5 ° C で振とう培養および静置培養した。一定期間の培養液をろ紙 ( W h a t m a n N o . 2 ) で吸引ろ過し、培養ろ液を得た。一定期間培養後培養ろ液が生産する揮発性物質の抗菌活性を A . b r a s s i c i c o l a O - 2 6 4 胞子発芽抑制で検定した。検定方法は、培養ろ液 1 m l をろ紙 ( 直径 9 c m ) に滴下し、シャーレの下側に貼付けてシャーレを上下逆にし、ろ紙を上面にして、下側に D W で湿らせたろ紙 ( 直径 6 c m ) を敷き、その上にスライドグラスを置き、胞子濃度を  $5 . 0 \times 1 0 ^ 5$  個 / m l に調整した O - 2 6 4 菌株の胞子懸濁液を 1 枚につき 2 カ所、3 0 μ l ずつ滴下した。パラフィルムでシャーレを密封し、暗下、2 5 ° C で 2 4 時間静置後、胞子発芽を測定し、前述した式により抑制率を算出した。

30

【 0 0 3 6 】

< 結果 >

ブナシメジ T U F C 1 1 9 0 6 菌株を接種した M A 液体培地を振とうし、2 および 3 週間培養した結果、希釈倍率 2 0 倍でそれぞれ 6 8 . 3 % と 8 5 . 3 % の胞子発芽抑制率を示した ( 表 . 2 ) 。一方、菌株を接種した M A 液体培地を静置し、4 および 5 週間培養した場合には、希釈倍率 1 0 倍でそれぞれ 7 1 . 6 % と 7 8 . 3 % の抑制率を示した ( 表 . 3 ) 。振とう培養 2 週間後に得られた培養ろ液が、希釈倍率 8 0 倍で 3 9 . 3 % の抑制率を示したことより、この培養ろ液中に最も強い抗菌活性物質が産出されている可能性が示唆された。今後は、ブナシメジ T U F C 1 1 9 0 6 菌株を接種した M A 液体培地を振とう 2 週間培養し、得られた培養ろ液を用いて実験を行うことにした。

40



## 【表 2】

表 2. ブナシメジの振とう培養ろ液における揮発性物質の抗菌活性

ブナシメジ 培養ろ液	反復	孢子発芽抑制率 (%)						
		希釈倍率						
		x1(原液)	x10	x20	x40	x80	x160	x320
2週間培養	1	100.0	77.5	67.5	57.9	43.8	6.9	1.3
	2	100.0	80.7	69.1	53.4	34.7	17.9	14.8
	平均	100.0	79.1±1.6	68.3±0.8	55.7±2.3	39.3±4.6	12.4±5.5	8.1±6.8
3週間培養	1	100.0	90.8	90.7	45.7	8.5	1.5	0.7
	2	100.0	87.3	79.8	59.9	10.0	1.9	0.8
	平均	100.0	89.1±1.8	85.3±5.5	52.8±7.1	9.3±0.8	1.7±0.2	0.8±0.1

10

## 【表 3】

表 3. ブナシメジの静置培養ろ液における揮発性物質の抗菌活性

ブナシメジ 培養ろ液	反復	孢子発芽抑制率 (%)						
		希釈倍率						
		x1(原液)	x10	x20	x40	x80	x160	x320
4週間培養	1	100.0	71.4	50.3	11.9	12.3	8.3	1.9
	2	100.0	71.8	30.9	16.2	2.9	3.3	1.4
	平均	100.0	71.6±0.2	40.6±9.7	14.1±2.2	7.6±4.7	5.8±2.5	1.7±0.3
5週間培養	1	98.9	79.2	48.1	13.2	10.2	0.8	2.1
	2	100.0	77.3	60.1	26.5	3.5	2.6	1.6
	平均	99.5±0.6	78.3±1.0	54.1±6.0	19.9±6.7	6.9±3.4	1.7±0.9	1.9±0.3

20

## 【0037】

## 3. ブナシメジ培養ろ液より有機溶媒抽出した画分に含まれる揮発性物質の抗菌活性

30

## &lt; 方法 &gt;

ブナシメジ T U F C 1 1 9 0 6 菌株を M A 液体培地で 2 週間振とう培養し、得られた培養ろ液および培養ろ液からのジエチルエーテル ( E t <sub>2</sub> O ) 抽出画分と非抽出画分の揮発性物質の抗菌活性を上述と同様の方法を用い、O - 2 6 4 孢子発芽抑制で検定した。また、抗菌活性の強さを各画分の希釈倍率により評価した。

次に、培養ろ液からの E t <sub>2</sub> O 抽出画分における各種植物病原菌類の孢子発芽抑制および菌糸生育抑制について前述と同様な方法で検定を行った。全ての菌の孢子懸濁液の濃度は  $5 \times 10^5$  個 / m l とした。

## 【0038】

## &lt; 結果 &gt;

40

ブナシメジの振とう培養ろ液は希釈倍率 1 6 倍で抑制率 6 1 % を示し、一方、培養ろ液よりの E t <sub>2</sub> O 抽出画分では希釈倍率 1 6 倍で抑制率 8 3 % と高い抗菌活性を示した。しかしながら、非抽出画分において全く抗菌活性は見られなかった ( 表 4 ) 。

## 【表4】

表4. ブナシメジの振とう培養ろ液、培養ろ液よりのEt<sub>2</sub>O抽出画分および非抽出画分における揮発性物質の抗菌活性

検定画分	反復	孢子発芽抑制率 (%)						
		1(原液)	x2	x4	x8	x16	x32	x64
培養ろ液	1	100	100	100	68.8	64.2	52.9	-0.4
	2	100	100	100	75.2	57.8	39.4	0.5
	平均	100	100	100	72.0±3.2	61.0±3.2	46.2±6.8	0.1±0.5
-----								
培養ろ液: Et <sub>2</sub> O抽出 画分	1	100	100	100	98.8	89.6	54.8	12.0
	2	100	100	100	97.9	77.1	33.0	6.1
	平均	100	100	100	98.4±0.5	83.4±6.3	43.9±10.9	9.1±3.0
-----								
培養ろ液: Et <sub>2</sub> O非抽 出画分	1	4.3	1.1	-2.3	-	-	-	-
	2	5.1	-3.7	-2.2	-	-	-	-
	平均	4.7±0.4	-1.3±2.4	-2.3±0.1	-	-	-	-

10

## 【0039】

次に、培養ろ液からのEt<sub>2</sub>O抽出画分における5種類の植物病原菌類の孢子発芽に対する影響を見た結果(表5)、キャベツ黒すす病菌O-264菌株の孢子発芽に対して顕著に抗菌活性を示した。その活性は希釈倍率8倍で52.6%の抑制活性を示した。その他の4種の病原菌の孢子に対しても60%以上の抑制率を示したが、希釈倍率2倍では完全に抗菌活性はみられなかった。

20

【表5】

表5. ブナシメジの培養ろ液Et<sub>2</sub>O抽出画分における揮発性物質の各種病原系状菌に対する孢子発芽抑制活性

検定病原菌	反復	孢子発芽抑制率 (%)						
		Et <sub>2</sub> O抽出画分 (希釈倍率)						
		1(原液)*	x2	x4	x8	x16	x32	x64
Alternaria	1	62.0	53.6	43.7	10.9	—	—	—
alternata	2	62.4	40.8	21.2	-3.9	—	—	—
Japanese pear pathotype	平均	62.2±0.2	47.2±6.4	32.5±11.3	3.5±7.4			
O-276菌株								
Alternaria	1	100	100	98.9	59.3	12.4	15.3	1.1
brassicicola	2	100	100	100	45.9	28.3	27.7	4.3
O-264菌株	平均	100	100	99.5±0.6	52.6±6.7	20.4±8.0	21.5±6.2	2.7±1.6
ABC-001菌株								
Botrytis	1	67.4	32.3	5.1	-2.3	—	—	—
cinerea	2	92.6	30.7	-2.8	0.0	—	—	—
ABC-001菌株	平均	80.0±12.6	31.5±0.8	1.2±4.0	-1.2±1.2			
C-14菌株								
Colletotrichum o	1	63.1	33.4	-9.8	6.9	—	—	—
rbiculare	2	77.0	20.2	15.7	-4.8	—	—	—
C-14菌株	平均	70.1±7.0	26.8±6.6	3.0±12.8	1.1±5.9			
LC-93020菌株								
Corynespora	1	63.9	29.1	8.0	-7.3	—	—	—
cassiicola	2	58.2	32.5	2.6	5.0	—	—	—
LC-93020菌株	平均	61.1±2.9	30.8±1.7	5.3±2.7	-1.2±6.2			

10

20

## 【0040】

さらに、同じ病原菌類の菌糸生育に対する影響について調査した結果(表6)、孢子発芽の検定と同様に、O-264菌株の菌糸生育を抑制率60%と、最もよく抑制した。しかし、その他の病原菌の菌糸生育においては殆ど抑制しなかった。以上のことから、ブナシメジ揮発性抗菌物質は菌糸生育よりも孢子発芽に対しての抗菌作用が強いことが示唆された。

30

【表6】

表6. ブナシメジの培養ろ液Et<sub>2</sub>O抽出画分における植物病原系状菌の菌糸生育に対する抗菌活性

検定病原菌 (菌株)	コロニー直径 (mm) (菌糸生育抑制率: %)				
	処理			コントロール	
	1	2	抑制率 平均±SD	1	2
Alternaria alternata	17.9 (-3.5)	18.5 (0.5)	-1.5±2.0	17.3	18.6
Japanese pear pathotype (O-276)					
Alternaria brassicicola (O-264)	4.1 (65.3)	5.6 (55.2)	60.3±5.1	11.8	12.5
Botrytis cinerea (ABC-001)	17.2 (8.5)	17.0 (0.6)	4.6±4.0	18.8	17.1
Colletotrichum orbiculare (C-14)	6.4 (17.9)	6.3 (17.1)	17.5±0.4	7.8	7.6
Corynespora cassiicola (LC-93020)	7.9 (3.7)	8.2 (-2.5)	0.6±3.1	8.2	8.0

40

1) コロニー直径 = 直径(mm) - 菌糸体ディスク直径(4 mm)

## 【0041】

## 4. ブナシメジ揮発性物質の抗菌作用

50

## &lt; 方法 &gt;

Et<sub>2</sub>O抽出画分（培養液と同濃度）を染込ませたる紙を貼付けたシャーレにO-264孢子懸濁液（10<sup>6</sup>個/ml）を滴下したスライドグラスを入れて密封した。1日または2日後に処理したEt<sub>2</sub>O抽出画分を除去するため、スライドグラスをEt<sub>2</sub>O抽出画分のないシャーレに移し密封して1日後に孢子発芽率を測定した。また、Et<sub>2</sub>O抽出画分連続処理および無処理の密封シャーレ内に置いたスライドグラスの孢子発芽率を測定し、無処理の孢子発芽率よりEt<sub>2</sub>O抽出画分処理による孢子発芽抑制率を算出した。

## 【0042】

## &lt; 結果 &gt;

ブナシメジ揮発性抗菌物質を含むEt<sub>2</sub>O抽出画分処理により、O-264菌株の孢子発芽は顕著に抑制され、密閉状態で3日間においても抗菌活性は持続した（表7）。また、処理1日後に揮発性物質を除去した場合、1日後には6割の孢子は発芽を開始し、処理2日後に除去した場合でも同様の結果となり、ブナシメジ揮発性物質の抗菌作用は静菌的であることを示した。そのため、ブナシメジ揮発性物質は、耐性菌が生じにくい、人や動物に対して安全性が高い、残留性を考慮しなくてもよい等の利点を有する。

## 【表7】

表7. キャベツ黒すす病菌O-264菌株の孢子発芽に対するブナシメジ揮発性抗菌物質処理および除去の効果

Et <sub>2</sub> O抽出画分処理および除去の時間	孢子発芽抑制率 (%)				平均±SD
	1	2	3	4	
処理1日	98.9	100.0	100.0	98.4	99.3±0.7
処理1日 + 除去1日	21.8	10.9	46.8	60.2	34.9±19.6
処理2日（連続処理）	100.0	99.0	100.0	97.8	99.2±0.9
処理2日 + 除去1日	72.8	44.2	5.5	21.9	36.1±25.3
処理3日（連続処理）	100.0	100.0	98.6	100.0	99.7±0.6

## 【0043】

## 5. ブナシメジ揮発性抗菌物質の単離・同定

## &lt; 方法 &gt;

ブナシメジ揮発性抗菌物質の精製の概略を図2に示す。精製した画分において上述と同様の方法を用い、O-264孢子発芽抑制で検定し、抗菌活性を評価した。活性が見られた画分においてGC-MS解析を行い、揮発性抗菌物質の同定を行った。

## 【0044】

## &lt; 結果 &gt;

図2の方法で揮発性抗菌物質を精製し、最終的に得られた画分において抗菌活性の検定を行った結果（表8）、ヘキサン：酢酸エチル＝90：10の2～4画分において抑制率100%を示した。これらの活性画分における抗菌活性の強さを各画分の希釈倍率により評価した結果（表9）、活性画分3において希釈倍率4倍で抑制率83%を示した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分の3つにおいてGC-MSで分析した結果、全ての画分において検出されるのは1つのピーク（RT：15.661min）のみであった（図3）。最も活性が強かった画分3においてこのピークは顕著に検出された（図3）。さらに、MS解析により、本ピークは2-メチルプロパン酸2,2-ジメチル-1-(2-ヒドロキシ-1-メチルエチル)プロピルエステル（分子量216.319）と同定された。

【表 8】

表 8. プナシメジ揮発性抗菌物質のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製画分における抗菌活性

溶出液 (ヘキサン:酢酸エチル)	画分	0-264孢子発芽率(%)			ave	抑制率(%)
		反復				
		1	2	3		
100:0	1(50ml)	87	97	94	92.66667	-0.7
95:5	1(10ml)	93	89	93	91.66667	0.4
	2(10ml)					
	3(10ml)	91	93	93	92.33333	-0.4
	4(10ml)					
	5(7ml)	92	89	95	92	0.0
90:10	1(10ml)	93	89	95	92.33333	-0.4
	2(10ml)	1	0	0	0.33333	99.6
	3(10ml)	0	0	0	0	100.0
	4(10ml)	0	0	0	0	100.0
	5(7ml)	83	93	75	83.66667	9.1
85:15	1(10ml)	93	93	90	92	0.0
	2(10ml)					
	3(10ml)	96	92	100	96	-4.3
	4(10ml)					
	5(7ml)	88	93	93	91.33333	0.7
80:20	1(10ml)	90	90	94	91.33333	0.7
	2(10ml)					
	3(10ml)	90	89	91	90	2.2
	4(10ml)					
	5(7ml)	92	90	91	91	1.1
75:25	1(10ml)	97	87	93	92.33333	-0.4
	2(10ml)					
	3(10ml)					
	4(10ml)	88	96	93	92.33333	-0.4
	5(7ml)					
70:30	1(10ml)					
	2(10ml)	97	95	97	96.33333	-4.7
	3(10ml)					
	4(10ml)					
	5(7ml)	95	98	98	97	-5.4
60:40	1(10ml)					
	2(10ml)					
	3(10ml)	95	87	92	91.33333	0.7
	4(10ml)					
	5(7ml)					
50:50	1(50ml)	90	100	97	95.66667	-4.0
0:100	1(50ml)	88	91	87	88.66667	3.6
control(ヘキサン)		98	91	92	93.66667	-1.8
control(酢酸エチル)		91	90	90	90.33333	1.8

10

20

30

【表 9】

表 9. シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分（ヘキサン：酢酸エチル=90：10の2～4画分）における希釈による活性への影響

活性画分	希釈倍率	0-264胞子発芽率(%)			ave	抑制率(%)
		1	2	3		
2	2	34	30	37	33.7	63.12523
	4	81	81	85	82.3	9.821103
	8	95	86	90	90.3	1.058781
	16	88	88	87	87.7	3.979555
3	2	0	0	0	0.0	100
	4	9	15	22	15.3	83.20555
	8	53	52	39	48.0	47.42607
	16	86	84	84	84.7	7.265425
4	2	35	25	25	28.3	68.96678
	4	65	75	67	69.0	24.42497
	8	89	76	88	84.3	7.630522
	16	83	86	86	85.0	6.900329
control(ヘキサン)		84	94	96	91.3	-0.03651

10

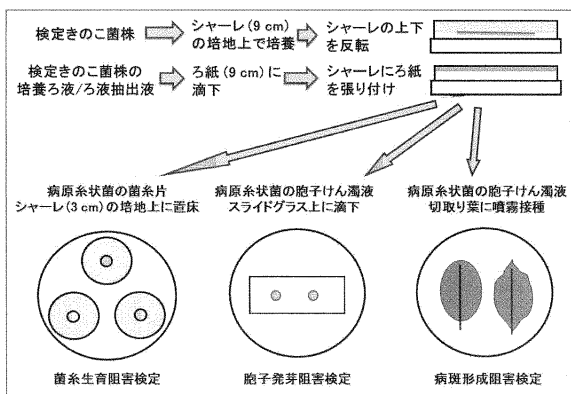
【産業上の利用可能性】

【0045】

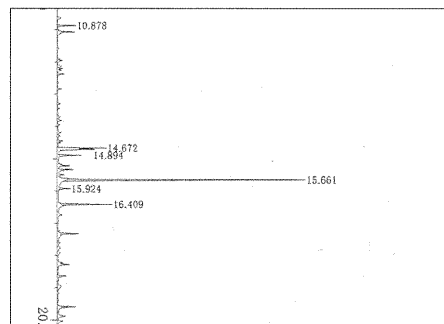
20

本発明は、抗菌剤や農薬の分野において利用可能である。詳細には、本発明の抗菌剤や農薬は、ハウスや植物工場などの施設栽培における病害防除、農作物収穫後の貯蔵倉庫における病害の防除、ならびに農作物出荷時のコンテナなど流通市場における病害の防除に使用できる。また、本発明は、一般家庭、病院、公共施設などの閉鎖室内の防菌・除菌にも使用できる。

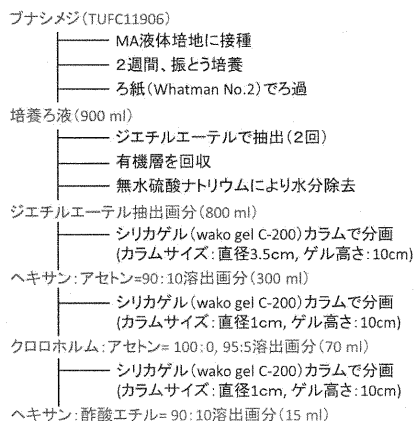
【図 1】



【図 3】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 石原 亨

鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内

審査官 鈴木 雅雄

(56)参考文献 特開2007-001961(JP,A)

特開2012-051897(JP,A)

特開2013-237699(JP,A)

特許第5561637(JP,B2)

RENJIE, Liang et al., GC-MS analysis of fennel essential oil and its effect on microbiology growth in rats' intestine, African Journal of Microbiology Research, 2010年, 4(12), 1319-1323

RADULOVIC, Niko et al., Composition and antimicrobial activity of Equisetum arvense L. essential oil, Phytotherapy Research, 2006年, 20(1), 85-88

GUO, Lei et al., Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of Scapania verrucosa Heeg. and its endophytic fungus Chaetomium fusiforme, Molecules, 2008年, 13(9), 2114-2125

ZHANG, Xiaoyun et al., Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent Bacillus atrophaeus CAB-1, Applied Microbiology and Biotechnology, 2013年, 97(21), 9525-9534

青柳康夫, きのこの味と香りの科学, きのこと研だより, 2008年, 31, 8-12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01N 37/02

A01P 3/00

C12P 7/62

C12R 1/645

CAplus/REGISTRY(STN)