

# 植物根面より分離した *Bacillus amyloliquefaciens* が生産する抗真菌ペプチドとその産生を亢進する植物由来成分に関する化学的研究

生命分子化学講座 生態化学分野  
園田純寛

## 【背景と目的】

ハクサイ根面から *Fusarium oxysporum* に対する抗真菌活性を有する細菌 NBCRF 株が分離され、*Bacillus amyloliquefaciens* と同定された。抗真菌活性は抗真菌物質の分泌によることがわかっている。本研究ではまず、抗真菌物質の単離精製と構造決定を行い、続いて抗真菌物質の産生を亢進する因子をオカラから探索した。

## 【抗真菌物質の単離精製と構造解析】

NBCRF 株を NB 軟寒天培地で培養した。凍結後融解した培養物の滲出液に硫酸アンモニウムを添加し、60%飽和時の沈澱を回収した。これを水に再溶解させ、*n*-ブタノールで抽出した。これを順相カラムクロマトグラフィーに供し、ニンヒドリン反応陽性画分と陰性画分の2画分に抗真菌活性を分けることができた。それぞれの画分を逆相カラムクロマトグラフィーによる分画を行った後、HPLC による精製分取を行った。その結果、ニンヒドリン反応陰性画分から NN-A (9.7 mg) を単離した。NN-A は分子量が 1042 を示し、Asx, Ser, Glx, Tyr, Pro をそれぞれ 3 : 1 : 1 : 1 : 1 で含むペプチド系化合物であることがわかった。iturin A2 は *Bacillus* が産生する環状リポペプチド系化合物であり、NN-A とよく似た性質を示す。NN-A を ESI-MS/MS に供したところ、iturin A2 に極めて類似したフラグメントパターンを示したことから、NN-A は iturin A2 である可能性が高いと考えた。一方ニンヒドリン反応陽性の画分には、*m/z* が 14 ずつ異なる多数の化合物が含まれていた。これらは *Bacillus* により iturin A 類と同時に産生されることの多い、環状リポペプチドである fengycin 類と分子量が一致した。このためニンヒドリン反応陽性画分の活性物質は fengycin 類である可能性が高いと考えられる。

## 【抗真菌物質の産生を亢進する植物由来成分の探索】

*Bacillus* をオカラを用いた培地にて培養することで、iturin A 類の産生量が増大することが報告されている。本実験では、オカラ中に抗真菌物質産生を亢進するなんらかの因子が存在すると推定し、その探索を行った。オカラのメタノール抽出物分画物を NB 培地に添加し NBCRF 株を培養した。培養液から *n*-ブタノールにより抗真菌物質を抽出し、抗真菌活性の亢進活性を検定した。メタノール抽出物を水に再懸濁し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次液液分配をおこなったところ、水層に最も強い亢進活性が認められた。次に Sephadex LH-20 (水-MeOH 系) カラムクロマトグラフィーに供したところ、水-MeOH (4:6) で溶出される画分に最も強い活性が認められた。この画分を逆相カラムクロマトグラフィー (水-MeOH 系) に供したところ、水で溶出される最初のフラクションに活性が認められた。これまでの実験により、亢進活性物質は無機塩、あるいは糖様の物質であることが示唆されている。