

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	田中 計実
審査委員	主査 石原 亨 (印)
	副査 一柳 剛 (印)
	副査 上野 誠 (印)
	副査 伊藤 真一 (印)
	副査 児玉 基一朗 (印)
題目	Antifungal Metabolites Produced by <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Biocontrol Strain SD-32
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>灰色かび病菌 (<i>Botrytis cinerea</i>) は、多くの作物に被害を及ぼす重要な病原菌である。従来、その防除には合成殺菌剤が用いられてきた。しかし、多くの殺菌剤に速やかに抵抗性を獲得しており、既存の農薬による防除が困難になりつつある。このような中、灰色かび病菌に対する生物農薬の探索が行われ、<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SD-32 株が灰色かび病の発生を抑制することが見出された。本研究は、<i>B. amyloliquefaciens</i> SD-32 株が灰色かび病を抑制するメカニズムを明らかにするため、この細菌が生産する抗菌性代謝産物を単離・同定し、その役割の解明を目指したものである。</p> <p>本研究では、まず、<i>B. amyloliquefaciens</i> SD-32 の培養ろ液から抗菌性物質を単離した。<i>B. amyloliquefaciens</i> SD-32 を培養し、その培養上清を抗菌活性試験を行いつつ分画した。その結果、最終的に4種の抗菌活性を有する環状リポポリペプチド <b>1-4</b> が単離された。分光学的手法と化学変換を駆使してその構造を解析したところ、<b>1-4</b> は、それぞれ <i>iso</i>-C<sub>15</sub>、<i>iso</i>-C<sub>16</sub>、<i>anteiso</i>-C<sub>17</sub>、および、<i>iso</i>-C<sub>17</sub> bacillomycin D であることが分かった。これらのうち、<b>1</b> と <b>2</b> は既知化合物であったが、<b>3</b> と <b>4</b> は文献未記載の新規化合物であった。</p> <p>続いて、これらの4種の化合物について13種の植物病原菌に対する抗菌活性を評価した。4種の化合物はそのうち12種の病原菌に対して抗菌活性を示したが、<b>3</b> と <b>4</b> は、<b>1</b> と <b>2</b> と比べ強い活性を示した。<b>1-4</b> が <i>B. cinerea</i> のキュウリへの感染を完全に阻害した濃度は、それぞれ、80、40、30、および30 μM であった。したがって、側鎖の炭素鎖が長いほど活性が高いことが分かった。</p>	

このように、*B. amyloliquefaciens* の培養上清から4種の bacillomycin D を単離することができたが、bacillomycin D の濃度を考えると、さらに別の物質が培養上清の抗菌活性にかかわっている可能性が示唆された。そこで、培養上清を分画し、bacillomycin D の抗菌活性を増強する物質の探索・精製を行った。その結果、bacillomycin D の活性を増強させる画分から、新たに5種の環状リポポリペプチド **5-9** が単離された。分光学的手法および化学変換によってその構造を解析したところ、**5-9** は、それぞれ、*anteiso-C*<sub>13</sub>、*iso-C*<sub>13</sub>、*iso-C*<sub>14</sub>、*anteiso-C*<sub>15</sub>、*iso-C*<sub>15</sub> [Ile<sup>7</sup>]surfactin であることが判明した。これらのうち、**5** と **6** は、新規化合物であった。

化合物 **5-9** は、単独では灰色かび病菌に対して抗菌活性を示さなかった。また、キュウリの子葉に *B. cinerea* を接種する際に、bacillomycin D と [Ile<sup>7</sup>]surfactin を同時に投与しても、*B. cinerea* の感染は抑制されるものの、菌糸成長は阻害されなかった。さらに、*in vitro* の菌糸成長阻害試験や孢子発芽阻害試験では、[Ile<sup>7</sup>]surfactin による bacillomycin D の活性の増強は観察されなかった。このことから、[Ile<sup>7</sup>]surfactin は、灰色かび病菌の感染過程に作用して bacillomycin D の効果を高めていることが示唆された。

以上の実験によって、本研究は、生物農薬として使用される *B. amyloliquefaciens* SD-32 株が bacillomycin D と [Ile<sup>7</sup>]surfactin を生産していることを明らかにした。Bacillomycin D は抗菌活性を有しており、*B. amyloliquefaciens* SD-32 株による病害抑制に主要な役割を果たしていることが推定された。また、SD-32 株は強い抗菌活性を有する C<sub>17</sub> bacillomycin D (**3** および **4**) を生産している点で、これまでに報告されている他の系統と異なることが分かった。さらに、[Ile<sup>7</sup>]surfactin は bacillomycin D の活性を増強していることを明らかにした。

これら一連の研究は、実用に供されている生物農薬の作用メカニズムを化学的見地から明らかにした点で高く評価することができる。得られた知見は、*B. amyloliquefaciens* SD-32 株から開発された生物農薬の利用範囲の拡大や、より優れた系統の育種法やスクリーニング法の開発にもつながり、生物農薬の一分野の確立に大きく貢献している。したがって、本研究の農薬学への寄与は非常に大きい。また、4種の新規化合物の発見は、天然物化学の観点からも重要である。以上を総合して、本論文は学位論文として十分な価値があると判定した。