

脂溶性抗菌物質を可溶化する分子カプセルの開発

吉清恵介・上野 誠

目 的

近年、放置された竹が育林被害、農作物被害、生活被害を引き起こしていることが全国的に問題となっている。一方で、竹は殺菌及び消臭効果があるとされ、食品保存のためなどに利用されるなど、古くからその有効性が経験的に知られている。我々はこれまでに、竹材の有効利用に関する研究において、竹に含まれる2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) が糸状菌の感染抑制効果を示すことを発表し、糸状菌の防除成分を含むバイオマスとしての竹材の可能性を示した。しかしながら、防除成分である DMBQ は水溶性が低いので、一般的に水溶液としての形状が好まれる農薬として幅広く利用することは困難であると考えられる。そこで我々は有機溶媒を用いること無く DMBQ を可溶化する手法として、環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) の包接能の利用を提案した。CD は6~8個の α -D-グルコピラノース基が α 1 \rightarrow 4結合により環状に連なったオリゴ糖であり、複数の水酸基が分子の外側に配向しているために分子全体としては水溶性の高い分子であるが、一方で分子中央にはエーテル状の酸素原子やメチレンの水素原子で囲まれた疎水性空洞が存在する。そのように分子中央に疎水性の空洞を持つ CD は、水溶液中で疎水性分子やカオトロピックな無機イオン等をその疎水性空洞に選択的に保持することが最大の特徴である。CD による分子やイオンの取り込みを「包接」とよび、CD に包接された分子の溶解度や酸化されやすさ等の物理化学的性質が変化することもしばしばある。本報告では、3種類の異なる空洞内径を持つ CD を用いて DMBQ の可溶化を試みて、どの CD が可溶化に最も適しているかを探索すること、また CD により可溶化した DMBQ を用いての糸状菌の感染抑制効果の検証を目的とした。

材料と方法

1. シクロデキストリン(CD)による DMBQ の可溶化実験
空洞内径の異なる三種類の CD (α -, β -, γ -CD) を用いて、DMBQ の可溶化を試みた。各種 CD を0, 2.5, 5, 15, 25, 35, 50 mg/mL の濃度で含む7種の水溶液を調製し、そこに過剰の DMBQ を加えて DMBQ 飽和溶液を調製した。その後マグネティックスターラーを用いて一定時間攪拌し、溶液を超高速液体クロマトグラフ (UFLC) を用いて分離し、各 CD 濃度における DMBQ

の溶解度を DMBQ 由来の 275 nm の吸収測定により調べた。UFLC にはフォトダーオードアレイ検出器を備えた Shimadzu Prominace UFLC を使用した。

2. イネいもち病菌胞子の発芽抑制実験

・供試菌

供試菌としてイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) を用いた (上野ら)。イネいもち病菌は米ぬか培地で2週間培養後、気中菌糸を除去し、インキュベータ内で2日間 BLB 蛍光灯 (FL20S, BLB National, Osaka, Japan : 300-420 nm) を照射して胞子形成を誘導した。

・胞子水溶液の調製

上記の方法で胞子形成させたシャーレに蒸留水を加え、胞子を筆で懸濁し、2重のティッシュペーパーを用いて菌糸を濾過した。その後、 5×10^5 spores/mL の胞子濃度となるように血球計算盤を用いて蒸留水で調製した。次に、調製した胞子懸濁液 1 mL をエッペンチューブに加えて、遠心分離 (15,000 rpm, 5分間) し、上清を除去して胞子のみを回収した。回収した胞子 (5×10^5 個) に DMBQ 水溶液、または CD により可溶化した DMBQ 溶液の 1 mL を加えよく攪拌し、一定量をスライドガラスに滴下し、暗黒下、27°C で1晩保ち、胞子発芽を光学顕微鏡で観察して胞子発芽率を算出した。

結果と考察

1. CD による DMBQ の可溶化実験

CD 濃度が0~15 mg/mL の範囲では、 β -CD が最も DMBQ の溶解に適していたが、それよりも高い濃度 (25~50mg/mL) においては α -CD の可溶化能が β -CD のそれを上回った。これにより今回用いた3種の CD の中では、 α -CD が DMBQ の高濃度水溶液を調製するのに適した CD であると判断した。これにより以降の実験では α -CD を用いて DMBQ を可溶化し、その溶液のイネいもち病菌胞子の発芽抑制効果を検証した。

2. イネいもち病菌胞子の発芽抑制実験

上述の CD 類による可溶化実験の結果、 α -CD を 50 mg/mL の濃度で用いることにより、通常の2倍程度の DMBQ を可溶化することに成功した。これは α -CD が、比較的疎水性の強い DMBQ を α -CD の疎水性空洞内に包接することにより、 α -CD-DMBQ 複合体として DMBQ を可溶化したことによると考えられた。 α -CD-DMBQ 複合体として可溶化した DMBQ は、溶液中で α -CD の空

洞内に包接された状態と、溶媒に放出された状態との平衡にある。本研究では、この平衡状態にある DMBQ の効果をイネいもち病菌の胞子発芽率で評価した。胞子発芽率は、観察した全胞子数に対する発芽した胞子数の割合を百分率で示した。

DMBQ 単体を蒸留水に溶解させて 50 ppm に調製し、その溶液にイネいもち病菌胞子を加えて胞子発芽を調査した結果、胞子発芽率は 43% であった。一方で、対照区として用いた蒸留水での発芽率は 100% であった。次に、 α -CD と包接平衡の状態にある DMBQ の胞子発芽抑制効果を検証するために、50 ppm の DMBQ 水溶液に 50 mg/mL の濃度で α -CD を加え、同様にイネいもち病菌の胞子発芽を調査した。その結果、胞子の発芽率は 93% となり、DMBQ による発芽抑制効果は著しく減少した。包接した DMBQ により胞子発芽抑制が減少した原因としては、 α -CD と DMBQ の包接錯体の安定性が高く、溶液中に放出される DMBQ の濃度が低い等の理由が考えられる。本実験では、 α -CD による DMBQ の包接が胞子発芽率へ及ぼす影響を調べるために 50 ppm の DMBQ 溶液に対して 50 mg/mL の濃度で CD を使用したが、今後は高濃度の DMBQ

溶液を用いて同様の実験を行い、評価実験を行う予定である。

最後に、 α -CD 可溶化 DMBQ 溶液で処理した胞子の顕微鏡観察により、新たに興味深い形態の変化が観察されたので簡単に紹介する。いもち病菌が宿主に感染する際には、通常は胞子が発芽管を伸ばし、その先に付着器を形成する。この付着器は宿主植物への侵入に必要な不可欠な器官であり、この形成無くしては宿主へ感染できない。興味深いことに、今回用いた α -CD 可溶化 DMBQ 溶液で処理した胞子の多くは発芽管を伸長したものの、感染に必要な付着器が形成されなかった。このことは、 α -CD 単独の水溶液でも観察されたことから、 α -CD 自身がイネいもち病菌胞子の感染を抑制できる可能性を示している。今後は α -CD 自体が持ついもち病菌の感染阻害効果を実際の植物を用いて評価する予定である。

引用文献

上野 誠・吉清恵介・久村由美子. (2010) イネいもち病菌が生産する光誘導抵抗性に係る因子の探索. 島根大学生物資源科学部研究報告 15: 54-55.