

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03812

研究課題名(和文)植物病原菌の誘引殺菌剤・忌避剤開発の基盤技術としての走化性制御物質の単離構造決定

研究課題名(英文) Isolation and structure determination of chemotactic regulatory substances as basic technology for the development of new plant protection method.

研究代表者

夏目 雅裕 (Natsume, Masahiro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10201683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の走化性誘引物質をトマトの根滲出液から単離し、その構造を機器分析および合成標品との比較により ethyl β -D-glucoside と同定した。Ethyl β -D-glucoside は $1 \mu\text{mol}/\text{disc}$ 以上で明確な活性を示し、他の立体異性体と D-glucose は不活性であった。トマトの生産する二次代謝産物や植物ホルモンが青枯病菌の走化性に及ぼす効果を調べた。その結果、数種の水酸化された芳香族カルボン酸と植物ホルモンの一種、ジャスモン酸が走化性誘引活性を示し、サリチル酸は濃度によって走化性誘引活性と忌避活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の走化性誘引物質に関する研究は古くから行われているが、従来は根滲出物の成分の走化性誘引活性を調べるにとどまっており、活性を指標に根滲出物から走化性誘引物質を単離構造決定した研究は本報告が初めてであり、その学術的意義は大きい。

トマトの二次代謝産物として報告されている水酸化された芳香族カルボン酸が走化性誘引活性や忌避活性を示すことを見出したことは、既知の走化性誘引物質がアミノ酸、有機酸や糖など水溶性物質であることを考えると、新しい発見であり、走化性誘引物質や忌避物質の農業への応用に新たな道を拓くものであると期待できる。

研究成果の概要(英文)：A chemoattractant of *Ralstonia solanacearum* isolated from the activated charcoal-adsorbed fraction of tomato root exudates was identified as ethyl β -D-glucopyranoside by instrumental analyses and comparison with synthetic preparations. Ethyl β -D-glucopyranoside showed unambiguous activity at above $1 \mu\text{mol}/\text{disc}$. Its stereoisomers and D-glucose were inactive.

The effect of secondary metabolites and plant hormones produced by tomato on the chemotaxis of *R. solanacearum* was studied. Several hydroxylated aromatic carboxylic acids and a plant hormone, jasmonic acid, showed chemoattractant activity. Salicylic acid showed both chemoattractant and repellent activity depending on the concentration.

研究分野：生理活性天然物化学

キーワード：青枯病 走化性 トマト 根滲出物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の新しい防除方法の開発を目的として植物成分に着目して探索を行った結果、雑草としてよく見かけるアメリカフウロがジャガイモの青枯病抑制に効果があることを見いだし [Ooshiro et al., *Weed Biol. Manag.*, 4, 187-194 (2004)]、その活性成分の一つとして没食子酸エチルを単離同定して、その構造活性相関を解明した [Ooshiro et al., *J. Pestic. Sci.*, 36, 240-242 (2011)]。

青枯病菌は土壌伝染性の植物病原細菌で、1) トマトやジャガイモなどのナス科を中心に 200 余種の植物に感染し、2) 熱帯から温帯を中心に世界各地に分布して、3) 宿主植物がいなくても土壌中で長期間生存することから、世界中で恐れられている難防除病原菌である。

青枯病菌は植物の根から滲出する物質に対する走化性で宿主植物を探索しており、走化性を欠損した変異株は病原性も低下することから [Tans-Kersten et al., *J. Bacteriol.*, 183, 3597-3605 (2001)]、走化性が病原性に重要な役割を果たしていることは明らかである。さらに、青枯病菌は宿主であるトマトの根浸出物に走化性を示すが非宿主であるイネの根浸出物は誘引作用が弱いこと、植物の根浸出液から同定されている糖、アミノ酸や有機酸のうちグルタミンなど数種のアミノ酸に走化性を示すことも報告されている [Yao et al., *J. Bacteriol.*, 188, 3697-3708 (2006)]。しかしこの論文では、トマトの根浸出物中の誘引物質がこれらアミノ酸なのか別の物質なのかは明らかにされていない。アミノ酸は多くの植物の根浸出液に含まれることが知られているので、我々は青枯病菌の宿主に対する走化性に、アミノ酸のような普遍的な物質のほかに、トマトなどの宿主植物に特異的な物質が重要な役割を果たしていると考えた。

一方、我々は没食子酸エチルの抗青枯病剤としての実用化研究の過程で、アメリカフウロを畑に鋤き込むと良好な青枯病防除作用を示すのに、活性成分である没食子酸エチルは高い薬量で散布しないと効果が見られないという現象に遭遇し、その理由が没食子酸エチルが土壌に吸着され易いためであることを明らかにした [大城、沖縄県農業研究センター研究報告、2, 30-80 (2009)]。アメリカフウロを鋤き込むという処理方法では没食子酸エチルが草体から徐々に滲み出すことで防除効果を示すと考えて、没食子酸エチルを徐放性製剤として施用したところ、青枯病防除に有効であることを見いだした。これに青枯病菌特異的な走化性誘引物質を組み合わせれば、青枯病菌を誘引して殺すという新しいタイプの薬剤を開発できるとの着想に至った。

これまでの研究の結果、1) アミノ酸や有機酸など既知の走化性誘引物質を含まないトマト根浸出液の活性炭吸着画分が走化性誘引活性を示すこと、2) 宿主・非宿主を問わない植物の探索の結果、ブラックマップの根浸出液活性炭吸着画分が強い走化性誘引活性を示すこと、を見出した。さらに、トマトとブラックマップの走化性誘引物質は数段階のクロマトグラフィーによる精製の結果、TLC で数スポットを示すまでに精製を進めることができ、糖を含む構造であることを示唆する結果を得ている。

2. 研究の目的

難防除性の植物細菌病である青枯病の新しい防除法の開発を究極の目的として、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の走化性誘引物質・忌避物質を植物の根浸出物から単離構造決定する。本研究では、1) これまでの研究で存在を確認し精製を進めてきたトマトおよびブラックマップ根浸出液に含まれる青枯病菌の走化性誘引物質の単離・構造決定と、2) トマトが生産する二次代謝産物や植物ホルモン類が青枯病菌の走化性に及ぼす効果を調べ、植物病原菌誘引殺菌剤および忌避剤開発のための青枯病菌走化性誘引物質・忌避物質の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

根浸出物の調製、走化性誘引活性の測定および走化性誘引物質の精製は既に発表している方法で行った [Hasegawa et al., *J. Gen. Plant Pathol.*, 84, 20-26 (2018)]。

トマトの根浸出液から単離した走化性誘引物質の構造決定は NMR 解析 (JNM-AL400) と質量分析 (micrOTOF-QII) により行った。Ethyl β -glucoside は隣接基関与法により、ethyl α -glucoside は Fischer グリコシド化反応により調製した。天然の走化性誘引物質と合成標品との比較は HPLC (Shimadzu LC-10 system, detector: RID-20A Refractive Index Detector, column: Inertsil Diol (5 μ m, 4.6 \times 250 mm), solvent: CH₃CN-H₂O (2:98), flow rate: 0.5 mL/min) で行なった。

4. 研究成果

(1) トマト根浸出物活性炭吸着画分に含まれる走化性誘引物質の構造決定

トマトの根浸出液から単離に成功した青枯病菌に対する走化性誘引物質の構造を NMR と MS 分析の結果から ethyl β -glucoside と推定し、その 4 種類の立体異性体を合成した。天然物と 4 種類の立体異性体の HPLC 分析と旋光度測定を行った結果、走化性誘引物質は ethyl β -D-glucoside であると決定した。さらに、4 種類の立体異性体の走化性誘引活性を測定した結果、ethyl β -D-glucoside のみが活性を示すこと、その強さはポジティブコントロールとしてこれまで実験に用いていた L-glutamine の約 1/30 であることを明らかにした。

図1 ethyl β-D-glucoside の構造

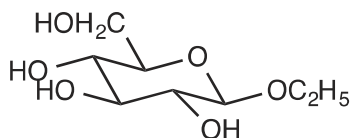
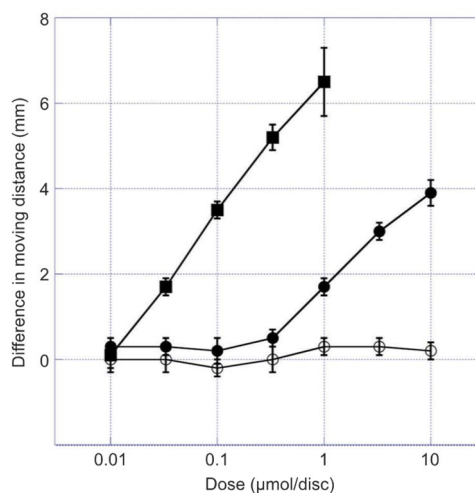


図2 ethyl β-およびα-glucoside と L-glutamine の走化性誘引活性の比較



■ : ethyl β-D-glucoside、● : ethyl α-D-glucoside、○ : L-glutamine

また、ethyl β-D-glucoside の青枯病菌 5 菌株に対する走化性誘引活性を調べたところ、3 菌株はこれまでバイオアッセイに用いてきた MAFF730138 株と同程度の反応を示し、残り 2 株は応答性が弱かった。しかし、応答性の弱かった 2 株は L-glutamine に対してもあまり誘引されなかったことから、これら 2 株は運動能が低い菌株であり、ethyl β-D-glucoside の走化性誘引活性は青枯病菌の菌株に対する特異性は無いと考えられた。

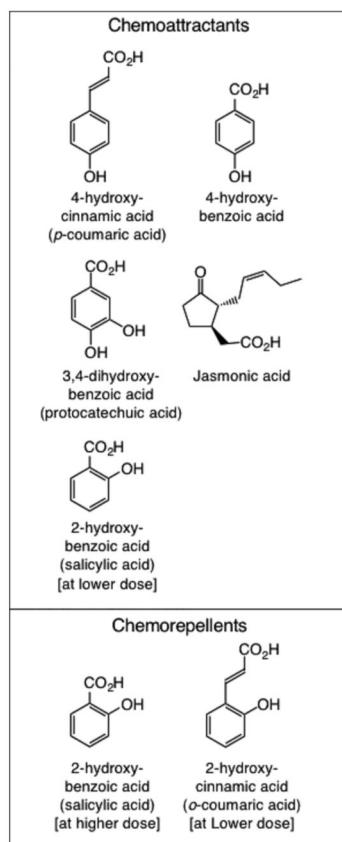
(2) ブラックマツペ根滲出液活性炭吸着画分に含まれる走化性誘引物質の精製

ブラックマツペの根滲出液に含まれる走化性誘引物質の精製を進めた結果、DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィーの 10% MeOH-CHCl₃ 画分と 30% MeOH-CHCl₃ 画分に活性を見いだした。いずれの画分も TLC 分析の結果、α-ナフトール-硫酸で発色する数個のスポットを与えたことから、糖を含む化合物であると考えられた。さらに、10% MeOH-CHCl₃ 画分を HPLC 分析した結果、トマト根滲出液から得られた走化性誘引物質 ethyl β-glucoside と同じ保持時間にピークを与え、NMR 解析により同定した。一方、30% MeOH-CHCl₃ 画分に含まれる活性物質は NH₂ シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、HPLC で 2 ピークを示すまでに精製することができた。また、LC-MS 分析の結果、そのうちの一つは *m/z* 193 にピークを与え、精密質量測定の結果から C₇H₁₄O₆ と推定され、呈色反応の結果と考え合わせると、メチル化糖と推定された。

(3) トマトの生産する二次代謝産物等が青枯病菌の走化性に及ぼす効果

トマトの生産する二次代謝産物など 30 化合物が青枯病菌の走化性に及ぼす活性を調べた。その結果、4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid) と 4-hydroxybenzoic acid が L-glutamine に匹敵する強い走化性誘引活性を有すること、3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid) と jasmonic acid が弱い誘引活性を示すことを見出した。一方、2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) は 0.33 μmol/disc では走化性誘引活性を示したが、3.3 μmol/disc では忌避活性を示した。また、1.0 μmol/disc では細菌の無指向性の運動を活性化したが、33 μmol/disc では青枯病菌の活動を低下させた。このような水酸化芳香族カルボン酸の青枯病菌の走化性誘引物質としての報告は初めてである。

図3 走化性誘引活性および忌避活性を示した化合物



(4) トマト根滲出物中の成分の青枯病菌の走化性誘引に対する寄与

我々が発見した新規走化性誘引物質、ethyl β-D-glucoside がトマト根滲出物の総走化性誘引活性にどの程度寄与しているかを調べた。その結果、ethyl β-D-glucoside を含む根滲出液の活性炭吸着画分はアミノ酸や有機酸を含む活性炭非吸着画分の約 1/2 の活性を示したことから、エチルグルコシドは単独で、根滲出物の走化性誘引活性に有意な寄与をしていると、結論付けた。また、各化合物単独での活性を比較した結果、ethyl β-D-glucoside はアミノ酸 (L-glutamine、glutamic acid、aspartic acid) や有機酸 (citric acid、fumaric acid、malic acid、succinic acid) と同程度の活性を示し、糖類は活性を示さないことが明らかになった。

トマトは品種によって青枯病に対する抵抗性が異なる。抵抗性と根滲出物の青枯病菌走化性誘引活性に相関があるかを調べるために、感受性のトマト品種大型福寿と抵抗性品種 LS-89 の根滲出物を調製して、走化性誘引活性を調べた結果、大型福寿の根滲出物の方が LS-89 の根滲出物より強い活性を示すことを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa Takuya, Okabe Atsushi, Kato Yusuke, Ooshiro Atsushi, Kawaide Hiroshi, Natsume Masahiro	4. 巻 82
2. 論文標題 Ethyl -D-glucoside: a novel chemoattractant of Ralstonia solanacearum isolated from tomato root exudates by a bioassay-guided fractionation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2049 ~ 2052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1515618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Takuya, Kato Yusuke, Okabe Atsushi, Itoi Chie, Ooshiro Atsushi, Kawaide Hiroshi, Natsume Masahiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Effect of Secondary Metabolites of Tomato (Solanum lycopersicum) on Chemotaxis of Ralstonia solanacearum, Pathogen of Bacterial Wilt Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 1807 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b06245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Takuya, Okabe Atsushi, Kato Yusuke, Ooshiro Atsushi, Kawaide Hiroshi, Natsume Masahiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Bioassay-guided isolation of a novel chemoattractant for Ralstonia solanacearum in tomato root exudates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 20 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-017-0752-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 琢也, 岡部 淳, 加藤 雄亮, 川出 洋, 夏目 雅裕
2. 発表標題 青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第七報)
3. 学会等名 日本農薬学会第43回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 琢也, 井樋 千絵, 岡部 淳, 加藤 雄亮, 川出 洋, 夏目 雅裕
2. 発表標題 トマトが生産する二次代謝産物に対する青枯病菌の走化性応答
3. 学会等名 平成31年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 琢也, 岡部 淳, 加藤 雄亮, 川出 洋, 夏目 雅裕
2. 発表標題 青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第3報)
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川 琢也, 岡部 淳, 加藤 雄亮, 川出 洋, 夏目 雅裕
2. 発表標題 青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第4報)
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2017年度大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川 琢也, 岡部 淳, 加藤 雄亮, 川出 洋, 夏目 雅裕
2. 発表標題 青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第5報)
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 琢也, 岡部 淳, 加藤 雄亮, 川出 洋, 夏目 雅裕
2. 発表標題 青枯病菌の走化性誘引物質の探索(第6報)
3. 学会等名 平成30年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物病原細菌の走化性誘引物質に関する研究 http://web.tuat.ac.jp/~chemreg/natsume2-2.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考