

令和元年6月21日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19244

研究課題名(和文) 青枯病菌のユニークな土壌潜伏機構の解明と予防薬開発

研究課題名(英文) Elucidation and regulation of the endofungal stage of *Ralstonia solanacearum*

研究代表者

甲斐 建次 (Kai, Kenji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：40508404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ralstonin類は異常アミノ酸と長鎖脂肪酸から構成され、その分子量は1000を超えていた。そのため、構造決定が難しい天然物であった。構造決定を成功させるには、より多くのralstonin類を高い純度で得ることが必要であった。青枯病菌は液体培養よりも、寒天培地で生育させた方がralstonin類を大量に産生することを確認済みであったため、寒天培地2000-3000枚から、各種クロマトグラフィーを駆使して、ralstonin類をmgオーダーで単離することに成功した。続いて、核磁気共鳴分光法、タンデム質量分析、アミノ酸分析や脂肪酸分析を駆使して、ralstonin類の構造を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青枯病菌の土壌潜伏の鍵因子であるralstoninの生理活性は、極めてユニークなものであり、単離・構造決定した純品のralsolamycinを使って生理活性を再現できれば、学術的に大きなインパクトとなる。植物病原細菌の土壌潜伏機構を化学的に証明することができれば、新しい化学防除法開発の契機になる。感染して症状が出てからしか対応できなかった既存の防除法では成し得ない、病気になる前に防ぐ「予防薬」を明確なメカニズムに基づいて設計できることになる。農業開発分野の大きなトピックスになることは間違いない。

研究成果の概要(英文)：*Ralstonia solanacearum* has an orphan hybrid polyketide synthase nonribosomal peptide synthetase gene cluster. We herein isolate its products (named ralstonins A and B) from *R. solanacearum* and elucidate their structures and biological activities. Ralstonins are unusual lipodepsipeptides composed of 11 amino acids (containing unique amino acids such as  $\alpha$ -hydroxytyrosine and dehydroalanine) and a 3-amino-2-hydroxyoctadecanoic acid, and their production is controlled by quorum sensing, a mechanism of bacterial cell-cell communication. Ralstonins exhibited chlamydospore-inducing activity and phytotoxicity.

研究分野：天然物化学

キーワード：ralstonin リポペプチド 青枯病菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、世界規模で猛威を振るう植物病原細菌である。本病はナス科を中心に、200 種以上の植物に急激な萎凋・枯死を引き起こす恐ろしいものであるが、有効な化学防除法は確立されていない難防除植物病害である。現在のところ、罹った場合はなす術がないのが実情である。さらに厄介なことに、一度、青枯病菌が発生した土壌中には、菌が多く生息し続けるため、再び青枯病菌が発生するという高いリスクが伴う。しかしこれまでに、青枯病菌を含め多くの細菌が土壌に潜伏し続ける分子メカニズムはほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

2016 年、青枯病菌が土壌中のカビの中に共生しているという衝撃的な事実が、権威ある微生物生態学雑誌 ISME Journal 誌に報告された (Spraker et al., 2016)。青枯病菌はより強いカビの中に隠れることで、悪環境にも耐えることができる可能性が示唆された。さらに、ralstonin と名付けられた環状ペプチドの生合成遺伝子 *rmv* クラスターを欠損させると、共生能が消失することが報告され、本物質がこのユニークな共生系の鍵因子であることが明らかになった。しかし、ralstonin の産生量が極めて微量であること、二次代謝物としては分子量が大きく構造が複雑なこと、やや不安定であることなどが原因となって、これまでのところ構造決定がなされていなかった。そこで本研究では、ralstonin 類の単離・構造決定を行うことにした。さらに、ralstonin がカビ細胞内への共生にどのように関与するのかを調べる。加えて、ralstonin 類の産生を阻害する化合物を探索し、青枯病菌が持つ土壌潜伏機構を使用不能にする「青枯病菌予防薬」を開発を目指した。

本申請研究で得られる成果は、植物病原細菌の土壌潜伏というブラックボックスの解明に貢献するだけでなく、土壌に潜む病原菌を効果的に除去する技術や、病気が発生した畑の再生法の開発への糸口にもなる。予想される波及効果は、微生物生態学と植物病理学における新分野開拓は言うまでもなく、農芸化学発のユニークな青枯病菌化学防除法の開発にまで及ぶことが期待される。したがって本申請研究は、「挑戦的研究 (萌芽)」の課題に相応しいと言える。

## 3. 研究の方法

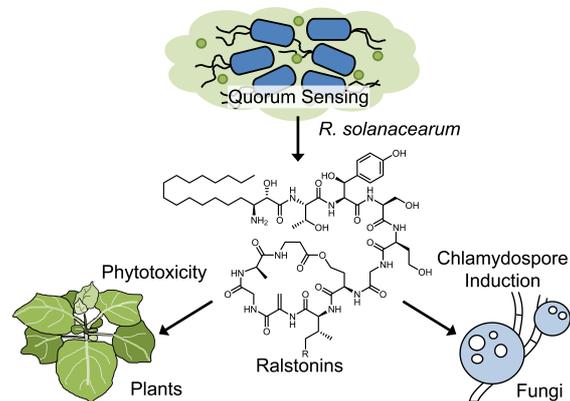
Ralstonin 類はリポペプチドと呼ばれる環状ペプチドの一群の化合物であることが、*rmv* 遺伝子クラスターの解析からほぼ確定していた。リポペプチドは異常アミノ酸と長鎖脂肪酸から構成され、その分子量は 1000 を超える。そのため、構造決定が難しい部類の天然物である。構造決定を成功させるには、より多くの ralstonin 類を高い純度で得ることが前提条件であった。青枯病菌は液体培養よりも、寒天培地で生育させた方が ralsolamycin 類を大量に産生することを確認済みであったため、寒天培地 2000-3000 枚から、各種クロマトグラフィーを駆使して、ralstonin 類を mg オーダーで単離することに成功した。続いて、核磁気共鳴分光法 (NMR)、タンデム質量分析 (MS/MS)、アミノ酸分析や脂肪酸分析を駆使して、ralstonin 類の構造を決定した。

次に、ralstonin 類が、青枯病菌がカビ中に侵入する上でどのような役割を担うかを調べる。*rmv* 遺伝子欠損株を作製し、ralstonin 処理でカビ細胞内への共生能が回復するかどうかを検証する。また、ralstonin をカビに処理した場合、カビ側でどのような遺伝子変化が起こるのかを RNA シーケンス法により調べ、ralstonin の活性発現機構の一端の解明を目指した。

## 4. 研究成果

Ralstonin A と B を単離し、機器分析と化学誘導体化、部分合成などを駆使することでこれらの化学構造を世界に先駆けて解明することに成功した。約 1 か月後に、ドイツのグループから全く同じ構造での構造決定が報告されており、なんとか競争に勝てた状態であった。Ralstonin 類はリポペプチドの中でもとてもユニークな構造をしており、構造決定の過程で開発した種々の方法は今後、同様なリポペプチドの構造決定に有効なものとなることが期待される。Ralstonin 類はカビの厚壁孢子誘導を持つことを、世界で初めて定量的に評価することに成功した。さらに、生合成欠損株を作製し、ralstonin 類のみが青枯病菌が産生する唯一の厚壁孢子誘導因子であることを明らかにした。Ralstonin 類の生合成が、菌密度依存の遺伝子発現機構に完全に制御されていることも明らかにした。これらの内容は、Organic Letters 誌に報告した。

詳細な解析を進める過程で、さらに新規の ralstonin C を見出し、単離・構造決定に成功した。Ralstonin 類の産生能が植物由来の糖類で増加することも見出し、植物 - 微生物間での重要性も見出されたため、それらの内容をまとめて、論文を投稿した。現在、マイナーリバイズの対応中であり、近い将来公開されることが期待される。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Murai Y, Mori S, Konno H, Hikichi Y, and Kai K. Ralstonins A and B, lipopeptides with chlamydospore-inducing and phytotoxic activities from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Organic Letters*, 19, 4175-4178 (2017). doi.org/10.1021/acs.orglett.7b01685 査読有.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 青枯病菌においてクオラムセンシング制御下にある PKS-NRPS が産生するリポペプチド ralstonin 類の構造決定と生物活性. 村井勇太、森祥子、今野博行、曳地康史、甲斐建次. 日本農芸化学会関西支部例会 (2019 年) .

2. 植物糖による青枯病菌二次代謝の活性化と病原力への寄与. 坂田恵, 石川陽子, 村井勇太, 大西浩平, 曳地康史, 甲斐建次. 日本農薬学会大会 (2019 年) .

3. Ralstonins A and B, unique lipopeptides synthesized by quorum sensing-dependent PKS-NRPS in *Ralstonia solanacearum*. Yuta Murai, Shoko Mori, Hiroyuki Konno, Yasufumi Hikichi, and Kenji Kai. ペプチド討論会 (2018 年) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷 修治

ローマ字氏名：Shuji Tani

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 80405357

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。