

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450137

研究課題名(和文) 植物病原菌誘引殺菌剤開発の基盤技術としての青枯病菌走化性誘引物質の探索

研究課題名(英文) Search for chemoattractant of *Ralstonia solanacearum* as a basic technology for development of a new type of bactericide

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：トマトの根浸出物に含まれる青枯病菌の走化性誘引物質の精製・単離を行った。トマト根浸出液をSep-Pak C-18、活性炭、Diolシリカゲル、NH<sub>2</sub>シリカゲルで精製することにより、走化性誘引物質の単離に成功した。走化性誘引物質は発色試薬に対する反応から、糖を構成成分として含む化合物であると推定された。

これまでに植物の根浸出物の走化性誘引活性を比較した研究はほとんどない。9種類の植物の根浸出物を調製して走化性誘引活性を調べた結果、ブラックマツペの根浸出物が強い走化性誘引活性を示すことを見出した。本活性物質もトマトの活性物質と類似の性質であるが、異なる物質であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemoattractant for *Ralstonia solanacearum* contained in the root exudates of tomato was isolated using Sep-Pak C-18, activated carbon, Diol silica gel and NH<sub>2</sub> silica gel columns. Chemoattractant is presumed to be a compound containing sugar as a component from the color reaction.

There have been few studies comparing the chemotattractant activity of root exudates of plants. We prepared root exudates of 9 plant species and investigated their chemoattractant activity. Among them, the root exudates of black gram showed strong activity. The active substance produced by black gram is similar to that of tomato, but it is considered to be a different substance.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：青枯病菌 走化性 根浸出液 トマト 誘引物質

### 1. 研究開始当初の背景

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は土壌伝染性の植物病原細菌で、トマトやジャガイモなどのナス科を中心に 50 科 200 余種の植物に感染し、熱帯から温帯を中心に世界各地に分布して、宿主植物がいなくても土壤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 [Tans-Kersten et al., J. Bacteriol., **183**, 3597-3605 (2001)] から、両者が密接に関連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滲出物に対して非宿主であるイネの根滲出物よりも強い走化性を示すこと、植物の根滲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 [Yao & Allen, J. Bacteriol., **188**, 3697-3708 (2006)] も報告されている。しかしこの論文では、トマトの根滲出液中の主要な誘引物質がこれらの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滲出液に含まれていることが報告されていることから、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、トマトやジャガイモ、あるいはナス科植物に特異的な物質も重要な役割を果たしていると考えた。

### 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、青枯病菌が走化性を示す宿主作物根滲出液中の誘引物質を、活性を指標に単離構造決定することを目的とする。これまでの研究で、トマト (品種: 大型福寿) の根滲出物の活性炭吸着画分が青枯病菌の走化性誘引活性を示すことを見出した。この画分には水溶性の高い糖、アミノ酸や有機酸は含まれないことから、我々が探索している宿主植物特異的な走化性誘引物質である可能性が高いと考え、本研究ではその単離構造決定を目的とした。また、これまでに植物の根滲出物の走化性誘引活性を比較した研究は前述の Yao らの研究のみであることから、青枯病菌の宿主・非宿主を問わず種々の植物の根滲出物の走化性誘引活性を調べた。

### 3. 研究の方法

青枯病菌は農業生物資源ジーンバンクから、トマトなど種々の植物種子は種苗会社から入手した。

植物の根滲出液は以下のようにして採集した; 0.8% 次亜塩素酸ナトリウム・0.1% Tween80 溶液に 6 分間浸漬して滅菌した植物種子を、ガーゼを敷いた 1 L ビーカーに 50 粒播種し、滅菌 RO 水 15 mL を加えて、25 暗所で萌芽させた。3 日後、ビーカー中の栽

培液を回収し、新しい滅菌 RO 水 20 mL を加えて、ファイトトロン (12L, 25 )-12D, 15 ) に移し、明暗条件下で 1 週間栽培した。栽培開始後 3 日目に栽培液を回収し、新しい滅菌 RO 水 20 mL を加えた。栽培期間終了後栽培液を回収し、それまでに回収した栽培液と合わせて根滲出液とした。

バイオアッセイは Okon らの軟寒天培地法 [Okon et al., Microb. Ecol., **6**, 277-280 (1980)] を改良して用いた。シャーレ (6 cm) に作成した軟寒天培地の中央に青枯病菌液をスポットし、菌液の端から 20 mm 離して試料を含ませたペーパーディスクと溶媒のみを含ませたペーパーディスクをシャーレの両端に置き、28 で培養した。3 日後と 7 日後にスポットした菌液の端からの試料側と対照側への移動距離を測定し、移動距離の差を走化性誘引活性とした。ポジティブコントロールにはグルタミン (2 および 0.2  $\mu\text{mol}/\text{disc}$ ) を用いた。

### 4. 研究成果

(1) トマト根滲出物活性炭吸着画分に含まれる走化性誘引物質の精製

これまでの実験の結果、トマト根滲出物の活性炭吸着画分に走化性誘引活性を認め、活性物質は酢酸エチルには抽出されず、Sep-Pak C18 や Oasis HLB には吸着されないことを明らかにしている。

そこで、トマト根滲出物の活性炭吸着画分を種々の吸着剤 (合成樹脂吸着剤、イオン交換樹脂、逆相系シリカゲル、各種修飾シリカゲルなど) のカラムに供し、活性物質の挙動を調べた。その結果、走化性誘引物質は Diol シリカゲルで効果的に精製できることが明らかになった。また、シリカゲルカラムでは活性の回収率が Diol シリカゲルに比べてやや劣った。そこでまず、根滲出液を Sep-Pak C-18 に通し、素通り画分を活性炭カラムに通したのち、活性物質を 80% acetone 水で溶出し、溶出液の acetone を留去した後に凍結乾燥して活性画分を得た。次いで、活性画分を Diol シリカカラムにかけて段階的に溶出したところ、活性は 10%  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$  画分に見いだされた。この活性画分の種々の発色試薬に対する反応を調べた結果、活性画分は  $\alpha$ -ナフトール-硫酸試薬により呈色し、ニンヒドリン試薬やドラーゲンドルフ試薬、ジフェニルヒドラジン試薬には反応しなかったことから、糖を構成成分として含むことが推定された。そこで、活性画分を  $\text{NH}_2$  シリカゲルカラムにかけ、フラクションコレクターを用いて 20 画分に分離し、活性を調べた結果、fr. 41-48 に活性を見出した (図 1)。得られた活性画分は HPLC で単一ピークを示したことから (図 2) 走化性誘引物質の単離に成功したと判断した。走化性誘引物質の収量は 1000 個体の根滲出液から約 2 mg であった。この画分は 120  $\mu\text{g}/\text{disc}$  で、グルタミン 0.2  $\mu\text{mol}/\text{disc}$  と同程度の青枯病菌誘引活性を示

した。

現在、質量分析、核磁気共鳴等の機器分析により、構造解析を進めている。なお、種々の一般的な単糖、二糖、三糖は走化性誘引活性を示さず、活性物質の R<sub>f</sub> 値もこれらの糖とは異なることは確認している（図3）。

図1 トマト根滲出物からの走化性誘引物質の単離

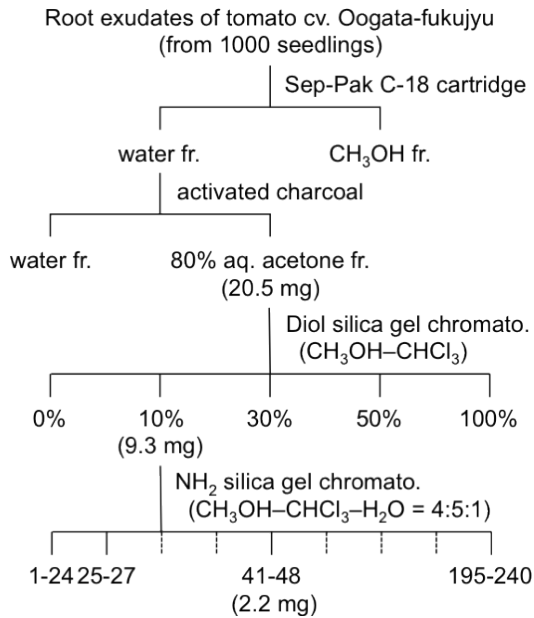


図2 HPLC による単離の証明

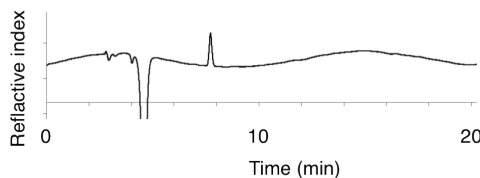
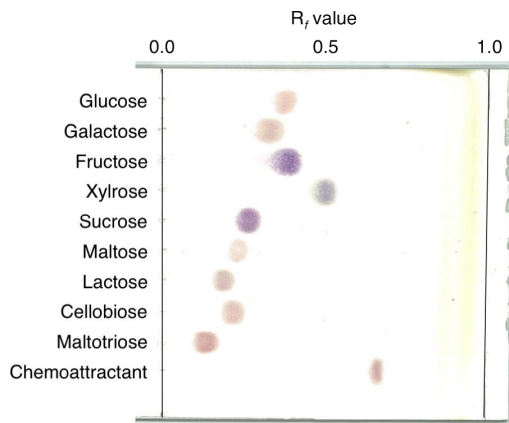


図3 TLC 分析による既知の糖との比較



(2) 種々の植物の根滲出物の走化性誘引活性

Yao & Allen は青枯病菌の宿主植物であるトマトの根滲出物の方が非宿主植物のイネの根滲出物より強い走化性誘引活性を示すことを報告した。根滲出物の走化性誘引活性の強弱と青枯病菌の宿主であるか否かに関係があるか興味を持たれたので、種々の植物

の根滲出物を調製して、走化性誘引活性を調べた。

その結果、ほとんどの植物の根滲出物は走化性誘引活性を示さなかったが、ブラックマッペの根滲出物が強い走化性誘引活性を示した（表1）。また、一部の植物種・画分について、忌避反応のような傾向が見られた。

表1 種々の植物の根滲出物の走化性アッセイの結果

植物名	画分	走化性アッセイ	
		1回目	2回目
プロックリー	活性炭吸着	-	-
	非吸着	-	+
コマツナ	活性炭吸着	×	-
	非吸着	×	×
キュウリ	活性炭吸着	+	-
	非吸着	-	-
ゴボウ	活性炭吸着	-	-
	非吸着	-	-
ネギ	活性炭吸着	×	-
	非吸着	-	-
ブラックマッペ	活性炭吸着	++	++
	非吸着	-	×
ナス	活性炭吸着	-	-
	非吸着	+	-
ピーマン	活性炭吸着	-	-
	非吸着	-	-
トウガラシ	活性炭吸着	×	-
	非吸着	-	×

++ : 強い誘引活性、+ : 弱い誘引活性  
 - : 活性無し、× : 忌避の傾向  
 供試量 : 植物芽生え 10 個体相当量/disc

(3) ブラックマッペ根滲出物に含まれる走化性誘引物質の精製

活性炭吸着画分をトマト根滲出液の精製法と同様の方法で精製を進めた。その結果、ブラックマッペの場合は活性炭吸着画分と共に Sep-Pak C-18 吸着画分にも活性が認められ、一方、アミノ酸や糖を含むと考えられる活性炭非吸着画分には活性が見られなかった。活性炭吸着画分をまず Diol シリカゲルカラムで精製したところ、活性はトマトの場合と同様、10% CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 画分に見いだされ、また 30% CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 画分と CH<sub>3</sub>OH 画分も 10% CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 画分よりは弱い活性が確認された。10% CH<sub>3</sub>OH-CHCl<sub>3</sub> 画分は糖の発色試薬で呈色するが、二次元 TLC 分析の結果からは、トマトとは異なる物質である可能性が高いという結果を得ている。

(4) トマトのアレロパシー物質やフラボノイド等の代謝産物の走化性誘引活性

植物の根からはさまざまな物質が分泌されており、他の植物や微生物との相互作用に参与している。例えば根粒菌とマメ科植物の共生においては植物から分泌されるフラボ

ノイドが、菌根菌と植物の共生ではストリゴラクトンが重要な作用を担っている。また、植物病原糸状菌の遊走子が宿主植物の分泌するフラボノイドやテルペノイドに走化性を示したり、孢子発芽を促進する物質が根滲出物中に存在するとの報告もある。

そこで、トマトによって生産することが報告されているアレロパシー物質 [Yu et al., Soil Sci. Plant Nutr., 39, 13-22 (1993)] やフラボノイド類 [Slimestad and Verheul, J. Sci. Food Agric., 89, 1255-1270 (2009)] が青枯病菌の走化性に及ぼす作用を調べた。

その結果、ほとんどの化合物は走化性誘引活性は示さなかったが、4-hydroxybenzoic acid が強い活性を示した (表2)。

表2 種々のトマト代謝産物の走化性アッセイの結果

	供試化合物	誘引活性
アレロパシー物質	benzoic acid	-
	4-OH benzoic acid	++
	palmitic acid	-
	vanilic acid	-
	ferulic acid	-
	caffeic acid	-
	sinapinic acid	-
フラボノイド	naringenin	-
	kaempferol	-
	myricetin	-
	quercetin	-
	rutin	-
その他	isoferulic acid	-
	chlorogenic acid	-
	ellagic acid	-
	syringic acid	-

++ : 強い誘引活性、- : 活性無し  
供試量 : 2 μmol/disc、

#### (5) まとめ

本研究は、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、トマトの根滲出液に含まれる青枯病菌に対して特異的な走化性誘引物質の探索を目的として開始された。

従来の走化性誘引物質に関する研究はアミノ酸や有機酸、糖など植物の根滲出液に含まれる成分を分析してその走化性誘引活性を調べる研究がほとんどで、活性を指標に走化性誘引物質を探索した報告は我々の知る限り無い。このような状況で、トマトからこれまでに報告されていない新規走化性誘引物質を単離した意義は大きい。

また、宿主・非宿主にとらわれずに種々の植物の根滲出液を調べた結果、ブラックマッペの根滲出物中にトマトと類似の走化性誘引物質の存在を見出した。ブラックマッペに青枯病菌が感染するとの報告はこれまでの

ところない。ブラックマッペが根滲出物として生産分泌する走化性誘引物質の構造が、宿主であるトマトの生産する物質とどのように違うのか、青枯病菌のトマトとブラックマッペへの遊泳、接触、侵入過程にどのような差があるのか、興味ある問題である。

トマトは最も栽培化・品種改良が行われている作物の一つで、本研究で選抜した大型福寿は 1952 年に発表され、現在入手できる品種としては比較的古い部類に入る。品種改良の目的の一つに病気にかかりにくいことが挙げられることと、本研究で大型福寿が選抜されたことは、走化性誘引物質という観点から考えると興味深い。

今後、トマトとブラックマッペが生産分泌する走化性誘引物質の構造を明らかにして、構造活性相関や青枯病菌の誘引応答のメカニズムを明らかにしていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

長谷川琢也・岡部淳・加藤雄亮・川出洋・夏目雅裕、青枯病菌の走化性誘引物質の探索 (第二報)、日本農薬学会第 42 回大会、2017 年 3 月 8 日、愛媛大学城北キャンパス (愛媛県松山市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~chemreg/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目 雅裕 (NATSUME Masahiro)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号 : 10201683