

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580146

研究課題名(和文) トマト根浸出液に含まれる青枯病菌の走化性誘引物質の解明

研究課題名(英文) Search for chemoattractant of *Ralstonia solanacearum* in tomato root exudate

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)： トマトの根浸出液に含まれる青枯病菌の走化性誘引物質の探索を行った。トマト根浸出液を酢酸エチル抽出画分、活性炭吸着画分および非吸着画分に分画して走化性誘引活性を調べた結果、活性炭非吸着画分が最も強い活性を示し、活性炭吸着画分にも活性が認められた。活性炭非吸着画分のアミノ酸分析を行い、根浸出液に含まれる量のアミノ酸混合物と分析に用いた画分の活性を比較した結果、アミノ酸以外の誘引物質の存在が示唆された。

非宿主植物であるイネ、ナタネ、アルファルファの根浸出物の各画分の活性を比較した結果、トマトの活性炭非吸着画分が他の植物より強い誘引活性を示した。

研究成果の概要(英文)： Chemoattractant for *Ralstonia solanacearum* was searched in the root exudate of tomato. The root exudate of tomato was fractionated into EtOAc-soluble fr. and absorbed and non-absorbed (passed) fr. of activated charcoal column, and their chemoattractive activity was examined. Passed fr. of activated charcoal column showed strongest activity and absorbed fr. was less active. Comparison of chemoattractive activity between passed fr. and amino acid mixture equivalent to the fr. showed the presence of chemoattractant other than amino acids.

Fractionated root exudates of non-host plant of *R. solanacearum*, i.e. rice, rape and alfalfa were prepared and their chemoattractive activity was examined. As a result, passed fr. of activated charcoal column of tomato showed stronger activity than those of other plants.

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

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 [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走化性を示すが、非宿主であるイネの根滲出物は誘引作用が弱いこと、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 et al., 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誘引物質がこれらのアミノ酸なのか別の物質なのかは確認されていない。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。

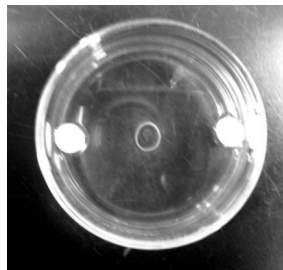
2. 研究の目的

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単離構造決定することを目的とする。本研究ではトマト根滲出液に含まれる青枯病菌の走化性誘引物質を明らかにするため、(1)トマト根滲出液からの誘引物質の精製、(2)誘引物質精製のためのトマト品種の選抜とバイオアッセイ方法の改良、(3)誘引物質のトマト水耕栽培液からの単離を行い、走化性誘引物質の単離構造決定を目指した。

3. 研究の方法

青枯病菌は農業生物資源バンクから、トマト種子は種苗会社から入手した。

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。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、青枯病菌液を中央にスポットして 28℃ で培養し、3日後と7日後に菌液をスポットした中心からの移動



距離を測定した。ポジティブコントロールにはグルタミンを用いた。

根滲出物中のアミノ酸は蛍光プレラベル法 (OPA/FMOC 法) による HPLC 分析により外標法で定量した。

4. 研究成果

(1) 被検菌の選抜

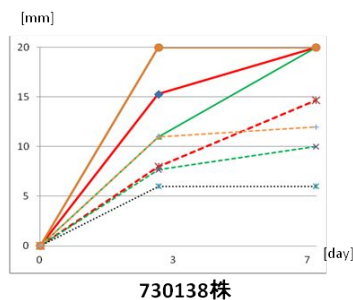
トマトから分離された biovar や分離場所の異なる青枯病菌7菌株を農業生物資源バンクより入手して、グルタミン (2 および 0.2 μmol/disc) に対する挙動 (結果の視認性、応答感度、応答速度、再現性) を観察し、視認性の良くなかった2菌株を除いた。

トマト (品種桃太郎) の種子をピーカー内で1週間水耕栽培し、回収した根滲出液を酢酸エチル抽出後、水相は活性炭カラムクロマトグラフィーにより精製して、酢酸エチル画分、活性炭吸着画分、活性炭非吸着画分に分画した。得られた各画分の走化性誘引活性を5菌株の青枯病菌で調べた結果、全ての菌株が活性炭非吸着画分にのみ活性を示した。応答性の良かった3菌株を候補として選抜した。

(2) トマト品種の選抜

桃太郎、ポンテローザ、世界一、大型福寿とミニトマトの千果の5品種の根滲出液を調製して、前項と同様に分画した。滲出物の収量は、千果は種子100粒あたり約7mg、その他の品種は約12mgで、大差はなかった。5品種の滲出物各画分に対する3菌株の青枯病菌の走化性応答を調べた結果、千果を除く4品種の活性炭非吸着画分に強い誘引活性が認められ、品種間の活性の差は小さかった。また、青枯病菌 MAFF730138 株は大型福寿の活性炭吸着画分にも走化性を示した。以上の結果から、青枯病菌 MAFF730138 株とトマト品種大型福寿の組合せで走化性誘引物質の探索を進めることにした。

走化性バイオアッセイの結果



- Gln 2μmol/disc 試料側への移動距離
- - * - - Gln 2μmol/disc 対照側への移動距離
- ▲— Gln 0.2μmol/disc 試料側への移動距離
- - * - - Gln 0.2μmol/disc 対照側への移動距離
- 桃太郎根滲出物活性炭非吸着画分
- 試料側への移動距離
- - * - - 対照側への移動距離
- * ネガティブコントロールの移動距離

(3) トマト根滲出物の精製

トマト種子 100 粒を水耕栽培し、根滲出液を回収、酢酸エチル抽出後、水相を活性炭カラムにかけて水洗浄、50%メタノール水溶出、80%アセトン水溶出を行って、分画した。水耕栽培から根滲出液の分画までを3回行い、各画分の走化性誘引活性を種子 10 粒相当量の試料を用いて調べた結果、活性炭カラム非吸着画分は3回とも最も強い活性を示した。50%メタノール水溶出画分は弱いながらも再現性良く誘引活性を示し、80%アセトン水溶出画分は3回中2回活性を示した。従来の走化性研究では植物の根滲出液に含まれることが明らかになっているアミノ酸や有機酸が用いられており、未知物質の探索は行われていない。今回、活性炭に吸着する比較的極性の低い走化性誘引物質の存在が示唆されたことは、大きな成果だと考える。

トマト根滲出物精製画分の走化性誘引活性

	1回目	2回目	3回目
酢酸エチル画分	-	-	-
活性炭カラム非吸着画分	+++	+++	+++
50%メタノール水溶出画分	+	+	+
80%アセトン水溶出画分	+	-	++

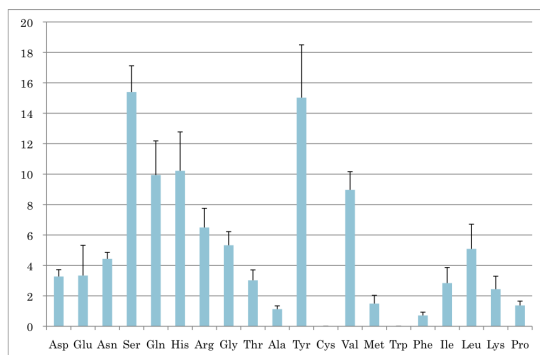
(試料供試量：種子 10 粒相当)

- +++ : Gln 2 μmol/disc 相当の活性
- ++ : Gln 0.2 μmol/disc 相当の活性
- + : Gln 0.2 μmol/disc より弱い活性
- : 活性無し

(4) トマト根滲出物活性炭非吸着画分のアミノ酸組成分析と走化性誘引活性

トマト根滲出物活性炭非吸着画分の青枯病菌誘引活性に対するアミノ酸の寄与を考察するためにアミノ酸の定量分析を行った。根滲出液の回収、活性炭カラムへの吸着・水洗浄、アミノ酸分析を3回行った。その結果、活性炭非吸着画分の収量は最大値と最小値で約2倍の違いがあり、アミノ酸量も2~3倍の違いが見られた。しかし、アミノ酸の全量に占める各アミノ酸の割合は比較の変動

トマト根滲出物活性炭非吸着画分のアミノ酸分析 (アミノ酸の全量に占める各アミノ酸の割合、%)

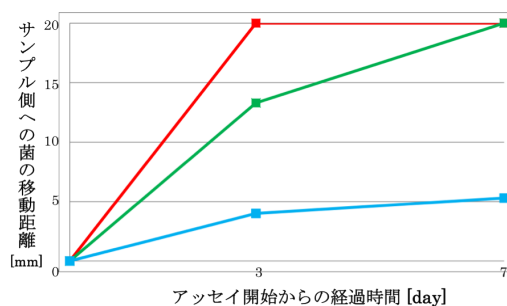


が小さく、チロシン (アミノ酸の全量に占める割合：15.1%)、セリン (15.0%)、ヒスチジン (9.7%)、グルタミン (9.5%)、バリン (8.9%)、アルギニン (6.6%) が多いことがわかった。

これらアミノ酸のうち、アルギニンと、溶解性が低いために試験ができなかったチロシン以外の4種は2 μmol/disc で青枯病菌の走化性誘引活性を示した。

トマト根滲出物活性炭非吸着画分とアミノ酸分析の定量値に従って調製したアミノ酸混合物の走化性誘引活性を比較した。その結果、トマト根滲出物活性炭非吸着画分を与えた場合、青枯病菌は強く誘引されて3日後には、菌液をスポットした中心から20mm離して置いたペーパーディスクまで移動が観察されたのに対し、アミノ酸混合物では13mm程度しか移動していなかった。この結果から、活性炭非吸着画分の走化性誘引活性はアミノ酸だけでは説明できず、別の種類の走化性誘引物質の存在が示唆された。

トマト根滲出物活性炭非吸着画分とアミノ酸混合物の活性の比較



- : トマト根滲出物活性炭非吸着画分
- : アミノ酸混合物
- : ネガティブコントロール

(5) 非宿主植物の根滲出物との走化性誘引活性の比較

Yao らは、宿主であるトマトの根滲出物是非宿主であるイネのそれに比べると、走化性誘引活性が低いと報告している [Yao et al., J. Bacteriol., **188**, 3697-3708 (2006)]。このことを確認するために、イネ、ナタネ、アルファルファを栽培し、根滲出液を酢酸エチルで抽出後、水相を活性炭カラムにかけて水洗浄、80%アセトン水溶出を行って、分画した。

種子 10 粒相当の各画分の誘引活性を比較した結果、いずれの植物も活性炭非吸着画分が強い誘引活性を示したが、トマトとの顕著な活性の差は認められなかった。また、トマト根滲出物で活性が見られた活性炭吸着画分には、イネで活性が見られたが再現性は認められず、ナタネとアルファルファでは活性は確認できなかった。一方、アルファルファの酢酸エチル抽出画分に誘引活性が見られた。宿主であるトマト根滲出物では活性が認められなかったのに対し、青枯病菌の宿主

としては報告例がないアルファルファの根滲出物の酢酸エチル抽出画分に誘引活性が見られたことは、興味深い発見である。

非宿主植物の根滲出物の青枯病菌誘引活性

	画分	1回目	2回目
イネ	酢酸エチル画分	-	-
	活性炭 吸着画分	+	-
	非吸着画分	++	++
ナタネ	酢酸エチル画分	-	-
	活性炭 吸着画分	-	-
	非吸着画分	++	++
アルファ アルファ	酢酸エチル画分	++	+
	活性炭 吸着画分	-	-
	非吸着画分	++	++

(試料供試量：種子 10 粒相当)

一方、活性炭非吸着画分の収量を考慮して、同一投与量で活性を比較したところ、トマトの活性炭非吸着画分が最も強い活性を示したが、他の植物の画分も十分に活性を示し、Yao らの報告ほどの違いは認められなかった。

根滲出物活性炭非吸着画分の活性の比較

	1回目 (265 µg)	2回目 (200 µg)
トマト	+++	+++
イネ	+	+++
ナタネ	++	+
アルファルファ	++	++

()内は試料供試量 (disc 当たり)

(6) 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。予備的な検討の結果、トマト根滲出物の酢酸エチル抽出画分に活性が認められたことから研究費を申請したが、本格的な実験に着手すると酢酸エチル抽出画分の活性が確認できなくなってしまった。トマトの栽培条件や青枯病菌の状態、試薬などを一つ一つチェックし、バイオアッセイを繰り返したが、特に問題点は見つからず、最も重要と考えた被検菌とトマト品種の選抜から検討することになってしまった。

従来の走化性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ていることが知られている成分しか対象にされておらず、Yao らの報告 (2006) において、トマト根滲出物がイネの根滲出物より強い誘引活性を示すことが明らかにされたものの、その活性本体の追求はなされていない。このような状況で本研究において、トマト根滲出物の活性

炭吸着画分が活性を示すことを見出したのは大きな成果であると言える。また、活性炭非吸着画分の活性にアミノ酸以外の物質が関与している可能性が示唆されたことから、トマトに特異的な走化性誘引物質が存在する可能性を確信した。

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、トマト水耕栽培液から根滲出物を大量に調製する方法を考案して、これらの画分に含まれる走化性誘引物質の単離・構造決定を進める予定である。

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)

岡部淳ら、青枯病菌の走化性誘引物質の探索、日本農薬学会第 39 回大会、2014 年 3 月 14 日、京都市

[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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし