

氏名	富田 駿
学位 (専攻分野の名称)	博士 (農芸化学)
学位記番号	甲 第811号
学位授与の日付	令和3年3月20日
学位論文題目	きのこを腐敗させる毒素 tolaasin に対する <i>Microbacterium</i> 属細菌による解毒機構
論文審査委員	主査 教授・博士 (農学) 横田 健治 教授・農学博士 五十君 静信 教授・博士 (農学) 篠原 弘亮 教授・博士 (農学) 對馬 誠也

論文内容の要旨

研究背景

きのこ腐敗病は *Pseudomonas tolaasii* を病原菌とする細菌病であり、広範な食用きのこに対して、子実体の褐変・腐敗を生じることから、国内外の原木および菌床きのこ栽培における重要病害である。*P. tolaasii* が分泌生産する tolaasin は、本病害の毒素成分として知られており、病徴を引き起こす原因物質として同定されている。Tolaasin はオクタデカペプチドと β -ヒドロキシオクタン酸から構成され、Thr14 残基の水酸基と Lys18 のカルボキシ基がエステル結合した環状構造を形成する環状リポペプチド (以下、cLP) である。

国内では、きのこ細菌病全般に対する登録農薬はなく、その防除には栽培環境の管理が唯一の策となっているため、野外で栽培を行う原木栽培ではその管理がままならない状況にある。一方で、環境影響負荷が小さく収穫間際の子実体に対しても施用できるなどの利点から、本病害に対しては生物農薬の開発が期待されており、これまでに本病害に対して防除活性を示す微生物株の探索が世界各国で行われてきた。本病害の生物防除を目的とした研究事例には、病原菌 *P. tolaasii* に対して生育阻害活性を示す拮抗微生物やバクテリオファージの選抜や機能解析が散見されるが、実用化には至っていない。

共同研究者の篠原は、本病害に対する新たな生物防除戦略として、tolasin の無毒化による生物防除法を考案し、健全なシイタケ子実体を分離源として tolaasin 解毒活性を示す数種の有用菌株を分離した。実用的な生物農薬の開発には、病害抑制効果をより高めるために、その有用生物の病害抑制機構を理解することが必要となる。そこで本研究では、有用分離菌株の中でも、とりわけ高い tolaasin 解毒能を示した *Microbacterium* 属細菌について、tolasin 解毒機構を解析した。

1. *Microbacterium* sp. K3-5 による tolaasin 解毒機構

Microbacterium sp. K3-5 (以下, K3-5) は, シイタケ子実体から分離された tolaasin 解毒菌株である。K3-5 培養液へ tolaasin を添加すると, 上清中の tolaasin を高効率に除去する。本菌の tolaasin 除去機構を明らかにするため, K3-5 培養液を菌体懸濁液と培養上清に分け, 各々の tolaasin 除去活性を評価した。K3-5 の tolaasin 除去活性は菌体懸濁液のみに認められ, 培養上清には活性が認められなかった。そして, 菌体懸濁液処理後の上清を LC-MSMS により分析したところ, tolaasin の分子内環状構造となる Thr14 残基の水酸基と Lys18 のカルボキシ基間のエステル結合を加水分解し, 開環した生成産物が同定された。K3-5 菌体処理による tolaasin 解毒能をジャガイモ塊茎切片の褐変変化およびエノキタケ(*Flammulina velutipes*) に対する抗真菌活性を指標とした生物検定により評価したところ, 顕著な解毒効果が確認された。以上の結果から, K3-5 の tolaasin の解毒機構は, K3-5 菌体で tolaasin を加水分解し, 生成産物を上清へ移行することを特定した。cLP の生分解については, surfactin 及び daptomycin について, 各々, *Streptomyces* 属による機構が報告されており, 何れも分泌型の加水分解酵素による環状構造の開環による抗菌活性の消失が挙げられる。K3-5 の tolaasin 解毒機構は, 既報の他の cLP 分子種の生分解様式と類似するが, 分泌型ではなく, K3-5 菌体にのみ活性が認められる新規の cLP 生分解様式であった。

2. *Microbacterium* 属基準菌株による tolaasin 解毒特性比較

Microbacterium 属基準株について, 前項の実験方法に従い, tolaasin 解毒活性を評価した。基準株 30 菌株は, K3-5 と同様に, 何れの菌株も培養上清に tolaasin 解毒活性は認められなかった。一方で, 何れの菌株も培養菌体に tolaasin 除去能が認められた。しかし, tolaasin 処理した菌体を, きの子実体の褐変を指標とした生物検定により解毒能を評価すると, 供試した基準菌株の中で, *M. foliorum* NBRC 103072^T を除く, 全ての菌株で tolaasin 処理菌体に毒素活性が認められた。さらに, tolaasin 解毒能を示さない *M. paraoxydans* NBRC 103076^T について, tolaasin 処理した菌体を 1 M NaCl もしくはメタノールで抽出したところ, 抽出液中に tolaasin が検出された。このことは, tolaasin 吸着能は *Microbacterium* 属に広く分布するが, tolaasin の解毒には不十分であることを明らかにした。一方, tolaasin 解毒能を示す *M. foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 処理菌体からは, tolaasin は回収されなかった。さらに, K3-5 で明らかにした tolaasin の開環による分解生成産物は検出されなかったことから, *M. foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 解毒機構は新規性が高いことが強く示唆された。

3. *Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 解毒様式

M. foliorum NBRC 103072^T の tolaasin 解毒機構を解析した。*M. foliorum* NBRC 103072^T 菌体へ tolaasin を処理し, その上清を LC-MS/MS で解析したところ, tolaasin の Ser6 と Leu7 間, もし

くは Val5 と Ser6 間のペプチド結合を加水分解した 4 種類の生成産物が検出され、*M. foliorum* NBRC 103072^T は、前述の K3-5 とは異なる、特異的な tolaasin 生分解様式により tolaasin を解毒することを明らかにした。さらに、本菌の培養菌体の 0.5 % Triton X-100 抽出液中には、同様の tolaasin 分解活性が検出された。菌体からのゲノム DNA 溶出量から、界面活性剤処理を行っても細胞構造を維持していることが予想され、tolaasin 加水分解酵素は菌体の表層付近に局在することが示唆された。以上の結果から、*M. foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 解毒機構は、cLP のペプチド鎖内部の特異的なペプチド結合を加水分解する新規の生分解様式によることを明らかにした。

4. *Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 生分解の特徴

前項で tolaasin 分解活性が認められた *M. foliorum* NBRC 103072^T 菌体の 0.5 % Triton X-100 抽出液ならびに菌体懸濁液の tolaasin 分解特性を比較した。各試料へ tolaasin を添加し、上清中の tolaasin 残存量と分解産物の生成量を経時的に解析したところ、抽出液中の tolaasin は分解産物の生成量に反比例して直線的に減少したのに対し、菌体懸濁液の上清中の tolaasin は、分解産物の生成量に反比例せずに、添加後速やかに減少した。また、両試料の tolaasin の除去及び分解産物の生成に対する pH の影響を比較したところ、抽出液では、tolaasin 除去と分解産物の生成は同じ挙動を示し、pH4 及び 5 で最も低く、pH9 で最も高い値を示した。一方で菌体懸濁液では、tolaasin 除去と分解産物の生成は抽出液とおおよそ同様の傾向を示すものの、pH4 において、分解産物は検出されないが、tolaasin 除去能は認められた。これらの結果は、本菌の菌体では、tolaasin の加水分解に先立ち、tolaasin が菌体へ吸着することを示した。そして本菌の高効率な tolaasin の解毒は、菌体表面に未同定の tolaasin 結合因子が存在し、効率的に tolaasin を菌体へ吸着した後に、菌体表層に局在する tolaasin 分解酵素によって成し遂げられることが示唆された。

5. *Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 分解酵素の推定

M. foliorum NBRC 103072^T の tolaasin 分解酵素の同定を目的として、tolaasin 分解活性を指標に酵素を精製し、ペプチドマッピングを行った。培養菌体の 0.5 % Triton X-100 抽出液を、陰イオン交換及び疎水性クロマトグラフィーにより tolaasin 分解活性画分を精製した。得られた粗精製物を、Blue Native-PAGE へ供し、泳動後のゲルの tolaasin 分解活性を評価したところ、140~240kDa 付近に tolaasin 分解活性が検出された。ゲルを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後、LC-MS/MS によりペプチドマッピングを行った。得られたペプチド断片のアミノ酸配列から、タンパク質を探索 (MASCOT サーチ) したところ数種のタンパク質が同定され、その中でプロテアーゼとしての働きを持つものは Aminopeptidase N のみであった。以上の結果より、*M. foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 分解酵素として、Aminopeptidase

Nを推定した。今後は、本酵素の遺伝子破壊株の作出や組換えタンパク質を作製し、tolaasin分解酵素の同定を行うとともに、その性状を明らかにする必要がある。

総 括

本研究では、きのこ腐敗病の毒素因子 tolaasin の解毒を戦略とした生物防除を目的として、tolaasin 解毒能を示す *Microbacterium* 属細菌の tolaasin 解毒機構を明らかにした。そして、本属の特定の菌株に見出された tolaasin 解毒能は、既報の cLP 生分解様式とは異なり、①tolaasin 加水分解酵素は分泌されず、菌体に存在すること、②菌株によって触媒部位が異なり、中でも③cLP のペプチド鎖の内部を分断する活性を示す菌株が存在することなどの新規の知見により成し遂げられることを明らかにした。併せて、本属に共通した菌体への高い tolaasin 吸着能は、tolaasin の菌体への吸着のみでは解毒に不十分であるが、菌体で tolaasin を加水分解する解毒菌にとっては、tolaasin の解毒を高効率なものとするを明らかにした。

有用微生物を利用した植物病害の生物防除については、詳細な病害抑制機構の解明が、より効果的な生物防除法を企てる上での礎となる。例えば、本研究で得られた成果として、本属の tolaasin 解毒には tolaasin 加水分解活性が鍵となる知見から、病害抑制に必要な酵素活性量を推定し、指標とすることで、本属菌株を応用した微生物製剤の散布法や散布時期などの最適化を図ることが可能となるであろう。将来、本研究の成果をもとに、生物防除剤を利用した安定的なきのこ栽培法が確立され、きのこ産業の発展に貢献することを期待する。

審 査 報 告 概 要

化学農薬の代替となる生物農薬は生き物を材料とすることから、その病害抑制機構が不明なものが多い。生物農薬の機能解明は、その効果を向上させるための礎となる。本研究では、化学農薬の登録がない、きのこ類に腐敗症状をもたらす細菌病の病原因子となる環状リポペプチド tolaasin の生分解機構を明らかにした。本研究で分離した菌株及びその近縁菌の解析から、菌体で tolaasin を加水分解することやその触媒部位などにおいて、既報の他の環状リポペプチド類の生分解機構とは異なる、新規の分解機構を明らかにした。さらに、菌体には、分解因子とは異なる、未同定の tolaasin 吸着因子が存在し、菌体への tolaasin の吸着が tolaasin 生分解の効率を向上させることを示した。これらの研究成果などを詳細に検討した結果、審査委員一同は博士（農芸化学）の学位を授与する価値があると判断した。