

きのこを腐敗させる毒素 tolaasin に対する
Microbacterium 属細菌による解毒機構

2021 年

富田 駿

第1章 緒論 (p.4)

第2章 *Microbacterium* sp. K3-5 による tolaasin 解毒機構 (p.7)

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

1-2 Tolaasin 精製

1-3 HPLC 分析条件

1-4 LC-MS 分析条件

1-5 上清中の tolaasin I 除去活性試験

1-6 *Flammulina velutipes* 1203A に対する抗真菌活性試験

1-7 ジャガイモ塊茎切片を用いた生物検定

1-8 上清中の tolaasin C 除去活性試験

2. 結果および考察

2-1 培養液による上清中の tolaasin 除去活性評価

2-2 Tolaasin 除去因子の局在

2-3 Tolaasin 分解箇所の特定

2-4 ジャガイモ塊茎切片を用いた tolaasin 解毒活性評価

2-5 *Flammulina velutipes* 1203A に対する抗真菌活性評価

2-6 Tolaasin C 除去活性評価

3. 要約

第3章 *Microbacterium* 属基準菌株による tolaasin 解毒能比較 (p.20)

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

1-2 Tolaasin 精製

1-3 HPLC 分析条件

1-4 上清中の tolaasin 除去活性試験

1-5 ジャガイモ塊茎切片を用いた生物検定

1-6 きの子実体を用いた生物検定

1-7 Tolaasin 処理後菌体細胞からの tolaasin I の抽出

2. 結果および考察

2-1 上清中の tolaasin 除去活性の比較

- 2-2 ジャガイモ塊茎切片による tolaasin 解毒活性評価
- 2-3 きの子実体による tolaasin 解毒活性評価
- 2-4 Tolaasin 処理した菌体からの tolaasin 回収

3. 要約

第4章 *Microbacterium foliorum* NBRC103072^T の tolaasin 解毒様式 (p.35)

1. 材料および実験方法

- 1-1 供試菌株
- 1-2 Tolaasin 精製
- 1-3 LC-MS 分析条件
- 1-4 LC-MS/MS 分析条件
- 1-5 菌体懸濁液による tolaasin 除去活性試験
- 1-6 菌体からの tolaasin 加水分解酵素抽出
- 1-7 酵素抽出液による tolaasin 分解活性試験
- 1-8 DNA 抽出および PCR

2. 結果および考察

- 2-1 Mf103072 株による tolaasin 加水分解
- 2-2 Mf103072 株からの tolaasin 加水分解酵素抽出

3. 要約

第5章 *Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T の tolaasin 生分解の特徴 (p.49)

1. 材料および実験方法

- 1-1. 供試菌株
- 1-2. Tolaasin 精製
- 1-3. LC-MS 分析条件
- 1-4. 菌体懸濁液による tolaasin 除去活性試験
- 1-5. 菌体からの tolaasin 加水分解酵素抽出
- 1-6. 酵素抽出液による tolaasin 分解活性試験
- 1-7. 異なる pH 条件における tolaasin 除去および分解活性試験

2. 結果および考察

- 2-1. 上清中の tolaasin 除去および分解の経時変化

2-2. 異なる pH 条件下での tolaasin 除去および分解活性評価

3. 要約

第 6 章 *Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T が保有する tolaasin 加水分解酵素の同定 (p.58)

1. 材料および実験方法

- 1-1. 供試菌株
- 1-2. Tolaasin 精製
- 1-3. LC-MS 分析条件
- 1-4. LC-MS/MS 分析条件
- 1-5. 菌体からの tolaasin 加水分解酵素抽出
- 1-6. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製
- 1-7. 疎水性相互作用クロマトグラフィーによる精製
- 1-8. Blue Native PAGE
- 1-9. ゲル内 tolaasin 分解活性評価
- 1-10. トリプシンによるゲル内消化処理
- 1-11. MASCOT サーチによるタンパク質の探索

2. 結果および考察

- 2-1 陰イオン交換クロマトグラフィーによる tolaasin 加水分解酵素精製
- 2-2 疎水性相互作用クロマトグラフィーによる tolaasin 加水分解酵素精製
- 2-3 Blue Native PAGE を用いたゲル内酵素活性評価
- 2-4 MASCOT サーチによるタンパク質の探索

第 7 章 総括 (p.69)

第 8 章 参考文献 (p.76)

第 9 章 謝辞 (p.81)

第1章

緒論

きのこの安定生産を脅かす要因の一つとして、細菌に起因する病害が挙げられる(Osdaghi et al., 2019)。中でも *Pseudomonas tolaasii* は、エノキタケ (*Flammulina velutipes* Sing) やシイタケ (*Lentinula edodes*)、ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*)、ツクリタケ (*Agaricus bisporus* Imbach) など、各種食用きのこを宿主とし、原木、菌床の栽培法を問わず腐敗等を引き起こし、国内外のきのこ栽培における重要な病害となる(Han et al., 2012; Thorn, 1996; Tolaas, 1915)。現在、国内ではきのこ類の細菌病害に対する登録農薬は無く、その防除には栽培環境の管理が唯一の策となっているが、野外で栽培する原木栽培では管理がままならない状況にある。

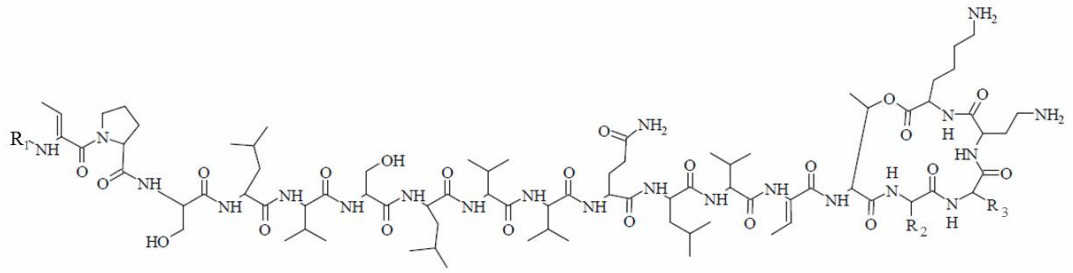
一方、生物農薬の開発が期待されており、これまでに本病害に対して生物防除活性を示す細菌が世界各国で探索されてきた。Sahin(2005)は *P. tolaasii* の拮抗微生物として抗菌活性物質を産生する *Streptomyces* 属菌株を分離した(Sahin, 2005)。また *P. tolaasii* に対して殺菌効果をしめすバクテリオファージを利用した本病害に対する生物防除方法についても複数の報告がなされている(Nguyen et al., 2012; Sajben-Nagy et al., 2012)。しかし、探索されてきた微生物株の病害抑制効果が実際に栽培現場で安定して発揮されないなどの問題により、本病害に対する生物農薬は未だ開発されていない。さらに、きのこの子実体形成には多様な菌叢が深く関わりっており、きのこ子実体の表原形質に影響を及ぼすことが報告されている(Pent et al., 2017; Splivallo et al., 2015)。このことから、拮抗細菌やバクテリオファージの生物農薬としての利用は、きのこ子実の菌叢を乱すことに繋がりきのこ生産に影響を与えかねない。

この問題の改善策として *P. tolaasii* の生育阻害ではなく、*P. tolaasii* が産生する原因毒素である tolaasin を直接解毒するという戦略が挙げられる。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) であり、きのこ腐敗病の原因物質である(Brodey, 1991; Nutkins et al., 1991)。本物質は、原形質膜に四量体が対称に配置されるホモ八量体の膜孔によりイオンチャネルを形成することで、きのこ子実体を褐変させる(Jo et al., 2011)。これまでに tolaasin は 7 種類の構造を持つことが知られており、その中で tolaasin I が tolaasin の中で

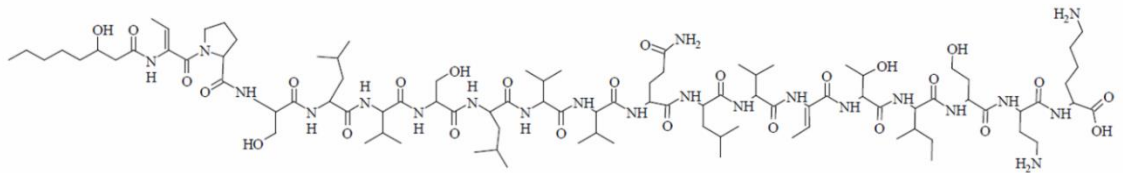
主要な構造である。また、これまでに tolaasin I と脂肪酸およびペプチド構造の異なる tolaasin II、A、B、D、E および tolaasin I の環状構造が開環した構造である tolaasin C が同定されている (図 1-1) (Bassarello et al., 2004)。Bassarello ら (2004) は 7 種類の tolaasin を用いて、各種微生物に対する抗菌活性を評価した結果、tolaasin C を除くすべての tolaasin は真菌とグラム陽性細菌に抗菌活性を示すことを明らかにした。

Tolaasin 解毒細菌として、*P. ostreatus* の褐変を抑制する働きを示す *Mycetocola* spp. が *Pleurotus ostreatus* の子実体から分離された。さらに、様々な食用きのこから分離された *Bacillus* sp.、*Sphingobacterium* sp.、*Pedobacter* sp.、*Acinetobacter* sp. が tolaasin 解毒能をもつことが報告された (Tsukamoto et al., 2002;2001;1998)。我々の先行研究においてもシイタケ子実体から 542 菌株を分離し、その中で *Microbacterium* sp. K3-5 を含む 12 菌株の tolaasin 解毒細菌がジャガイモ塊茎切片の褐変を指標とした生物検定により見出した (横田ら, 2018)。しかしながら、実際にきのこ栽培現場で生物防除剤として利用された例はない。実際に現場で病害抑制効果を示さないという問題を解決するためには、材料として用いる有用微生物の病害抑制メカニズムを詳細に解明することが必須である。すなわち本病害に対しては、毒素 tolaasin に対する解毒菌の解毒作用の解明が、安定した効果を示す生物防除剤の開発の礎となる。

本論文では tolaasin 解毒細菌を用いた生物防除剤の開発を目的として、*Microbacterium* sp. K3-5 およびその近縁菌について、tolaasin 解毒機構を解析した。



- Tolaasin I $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 Tolaasin II $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$
 Tolaasin A $R_1 = \text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$, $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 Tolaasin B $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 Tolaasin D $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
 Tolaasin E $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $R_3 = \text{H}$



Tolaasin C

図 1 Tolaasin 類縁体の化学構造

第 2 章

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

序文

先行研究において健全なシイタケ子実体から tolaasin 解毒細菌の分離が行われ、ジャガイモ塊茎切片の tolaasin による褐変化を指標とした生物検定の結果、*Microbacterium* sp. K3-5 株 (以下 K3-5) が tolaasin 解毒能を有することが明らかになった(横田ら, 2018)。しかし、本菌株による tolaasin 解毒がどのような機構で行われているかは未だ不明である。そこで、本章では健全なシイタケ子実体からの分離菌株である K3-5 株の tolaasin 解毒機構を解析した。

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

本学農学科篠原教授により分譲された *Pseudomonas tolaasii* 814 株を tolaasin 精製の際に用いた。また、先行研究により tolaasin 解毒細菌としてしいたけ子実体から分離された *Microbacterium* 属 K3-5 株 (横田ら, 2018) および *Bacillus subtilis* JCM 1465 株を tolaasin 除去活性試験の評価に用いた。大分県農林水産研究指導センター林業研究部有馬忍博士より分譲された *Flammulina velutipes* 1203A 株 は抗真菌活性に用いた。すべての供試菌株は使用までグリセロールストックとして-80°Cで保存した。

1-2 Tolaasin 精製

2 L の King's B 液体培地 (1% グリセロール, 2% Proteose peptone, 0.15% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15% K_2HPO_4) で *P. tolaasii* 814 株を 25°C、2 日間振とう培養後、遠心分離 (8,000 × g, 5 分間, 4°C) により培養上清を得た。培養上清を酢酸エチル 3 L で振とう抽出して、水層を分取し、分取した水層を 1-ブタノール 3 L で振とう抽出し、有機層を合併した。有機層をロータリーエバポレーターで乾固し、メタノール 10 mL に再溶解後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した (Purif-pack-Easy SI 60µm SIZE: 60, 昭光サイエンティフィック)。200 mL のメタノールで洗浄後、500 mL の溶出液 (メタノール:酢酸エチル = 1:1(v/v)) で溶出後、遠心エバポレーター (VC-36R, タイテック) で乾固し得られた白色粉末を 4°Cで保管した。

1-3 HPLC 分析条件

白田ら(1995)の方法を参考に、以下の分析条件で tolaasin を測定した。HPLC は日立高速液体クロマトグラフ LaChrom (日立ハイテクサイエンス) を用い、検出器には L-2455 ダイオードアレイ検出器を使用した。カラムには C8 カラム (Mightysil RP-8GP, 2.0mm ID×150mm, 関東化学) を使用した。移動相は A 液:0.1%トリフルオロ酢酸 B 液:0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルを使用し、流量 0.25mL/min、測定波長は 220 nm、インジェクション量 2 μ L、カラム温度は 30°Cで 30 分間のアイソクラティック条件で分析した。

1-4 LC/MS 分析条件

LC/MS 解析は Waters Acquity UPLC H class system (Waters) を用い、検出器には Waters Acquity QDa L-2455 を使用した。分析カラムは InertSustain C18 column UP (2.0 μ m, 2.1mm×100 mm, GL Sciences)を使用し、インジェクション量 1 μ L、流速 400 μ L/min、カラム温度 40°Cの条件で行った。溶離液は 0.1 %v/v ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 %v/v ギ酸アセトニトリル溶液 (B 液) を使用し、A 液として 70%→30% (リニアグラジエント 8 分間) の溶出条件で分析した。

1-5 上清中の tolaasin 除去活性試験

1-5-1 培養液を用いた上清中の tolaasin 除去活性

K3-5 株および比較対照として K3-5 株と同じグラム陽性細菌である *B. subtilis* JCM 1465 株について培養液を用いた上清中の tolaasin 除去活性を評価した。供試菌株を King's B 培地で 25°C、24 時間 振盪培養し、培養液の OD_{600nm} を測定した。培養液 2.5 mL に 20 mg/mL 精製 tolaasin 溶液を終濃度 0.4 mg/mL となる様に添加した。25°C、2 時間培養後、10,000×g、5 分間、4°Cで遠心分離を行い、上清 2 mL を採取した。上清 2 mL に対して 1-ブタノール 1 mL を添加して攪拌し 2,000×g、5 分間の遠心分離を行い、有機層を採取した。水層は 1-ブタノール 1 mL で再抽出し有機層を採取、合併した。合併した有機層は遠心エバポレーター (VC-36R, タイテック) で乾固し、40% メタノール水溶液 1 mL に再溶解した。再溶解液を 0.45 μ m セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP, 0.45 μ m, アドバンテック東洋) でろ過し、HPLC 分析に供した。Tolaasin 除去率は、King's B 培地 2mL に精製 tolaasin 溶液を終濃度 0.4mg/mL となるように添加し上記の抽出条件により調製した対照区における tolaasin I ピーク面積値に対して各菌株の tolaasin I 除去量を百分率で算出した。試験は 3 連で行った。

1-5-2 培養上清および菌体懸濁液による上清中の tolaasin 除去活性

1-5-1 の培養条件により得た培養液 3 mL を $10,000\times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}C$ で遠心分離を行い、 $0.45\mu m$ セルロースアセテートフィルター(DISMIC-25CS, $0.45\mu m$ アドバンテック東洋)に通した後に上清 2.5mL を 15mL ファルコンチューブに採取した。これを K3-5 株培養上清とした。この時得られた菌体を Phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗浄を行った。洗浄後の菌体を分光光度計で OD_{600nm} を測定した後、PBS で OD_{600nm} を 4 になるように希釈を行い、そのうちの 2.5mL を 15mL ファルコンチューブに採取した。これを菌体懸濁液とした。調整した菌体懸濁液および培養上清に精製 tolaasin 溶液 ($20mg/mL$) を $50\mu L$ 添加し $25^{\circ}C$ 、2 時間静置培養後、菌体懸濁液のみ、 $10,000\times g$ 、5 分間、 $4^{\circ}C$ で遠心分離を行った後、 $0.45\mu m$ セルロースアセテートフィルター(DISMIC-03CP $0.45\mu m$ アドバンテック東洋)でろ過した後に上清 2mL を 15mL ファルコンチューブに採取した。培養上清からは $500\mu L$ 抜いて、2mL にした。そして菌体懸濁液処理サンプルと培養上清処理サンプルの両方に 1-ブタノール 1mL を加えて、ボルテックスで攪拌した後、 $2,000\times g$ 、5 分間で遠心分離を行い、有機層を 2mL チューブに取った。残った水層に 1-ブタノール 1mL を加えて、ボルテックスで攪拌した後、 $2,000\times g$ 、5 分間で遠心分離を行い、有機層を採取して合併した。合併したブタノール層を遠心エバポレーターにより乾固させ(VC-36R, タイテック)、40%メタノール 1mL に再溶解し、 $0.45\mu m$ セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP $0.45\mu m$, アドバンテック東洋)に通した後、HPLC 分析に供した。また、培養上清処理区の対照区として King' s B 液体培地に、菌体懸濁液処理区の対照区として PBS に精製トラシン溶液を同様に添加して、そのうち 2mL を同様の条件で抽出、ろ過したものをを用いた。Tolaasin 除去率は 1-5-1 と同様の方法で算出した。

1-6 *Flammulina velutipes* 1203A に対する抗真菌活性試験

Flammulina velutipes 1203A 株を pH7.0 に調整した PDA 平板培地 (Oxoid) にストリークし $25^{\circ}C$ 、3 日間静置培養後、出現コロニーを滅菌水に懸濁し、 $OD_{600nm}=0.02$ となるように調整した。1-5 で得られた K3-5 培養液処理後 tolaasin 抽出液を PDB 培地(Difco)によって 2~64 倍まで段階的に希釈した。この試料 $100\mu L$ に調整した *F. velutipes* 1203A 株菌液 $100\mu L$ を添加した。また残存 tolaasin 濃度を算出する上の基準として段階的に希釈した精製 tolaasin 溶液 $100\mu L$ に *F. velutipes* 1203A 株菌液 $100\mu L$ を終濃度が $40\sim 1.25\mu M$ となるように添加した。調整した試料を 96well プレートにて静置培養し 24h、48h 後の OD_{600nm} を SH-1000 マイクロプレートリーダー (Corona Electric, Ibaraki, Japan)を用いて測定した。

Tolaasin 溶液における MIC (Minimum Inhibitory Concentration) を基準濃度とした。それぞれの試験区で毒素活性が見られた最も高い希釈倍率地点から、下記の数式で毒性を有する残存 tolaasin 濃度を算出した。

$$\text{【残存 tolaasin 濃度(mM)=MIC} \times (1/\text{希釈倍率)}\text{】}$$

細菌を含まない King's B 液体培地によって処理した時の残存 tolaasin 濃度を対象区として、下記の数式で解毒率を算出した。

$$\text{【Tolaasin 解毒率 (\%) = (対照区 - 試験区)/対照区} \times 100\text{】}$$

1-7 ジャガイモ塊茎切片を用いた生物検定

Tolaasin 除去活性の結果から試料中の tolaasin 濃度を推定し、K3-5 株菌体懸濁液処理後の上清を PBS で 2 から 256 倍まで希釈したものを試験区とした。また、残存 tolaasin 量を評価するため、tolaaasin 溶液を 20 から 1.25 μ M まで段階的に希釈した。調整した試料を濃度ごとに、厚さ 10mm 程度に薄く切ったジャガイモ塊茎切片に、それぞれ一枚につき 10 μ L を 5 箇所滴下し、25 $^{\circ}$ C、24 時間静置培養した。Tolaasin 溶液が毒性を示した最小の濃度を最小褐変濃度とした。それぞれの試験区で、毒素活性が見られた最も高い希釈倍率地点から、下記の数式で毒性を有する残存 tolaasin 濃度を算出した。

$$\text{【残存 tolaasin 濃度 (\mu M) = 最小褐変濃度} \times (1/\text{希釈倍率)}\text{】}$$

細菌を含まない King's B 液体培地によって処理した時の残存 tolaasin 濃度を対象区として 下記の数式で解毒率を算出した。

$$\text{【Tolaasin 解毒率 (\%) = (対照区 - 試験区) /対照区} \times 100\text{】}$$

1-8 上清中の tolaasin C 除去活性試験

Tolaasin C は精製 tolaasin 溶液を K3-5 株菌体処理する事によって得ることとした。K3-5 株培養液を 10,000 \times g、5 分で遠心分離を行い、得られた菌体を PBS で 2 回洗浄した。洗浄後の菌体を OD_{600nm} が 8 になるように PBS にて懸濁した。得られた菌体懸濁液に精製 tolaasin 溶液 (20mg/mL) を 10mL 添加し、25 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000 \times g、5 分で遠心分離を行ったあと、上清を回収した。回収した上清に、1-ブタノール 10mL を加えて、ボルテックスで攪拌した後、2,000 \times g、5 分間で遠心分離を行い、有機層を得た。残った水層に 1-ブタノール 10mL を加えて、ボルテックスで攪拌した後、2,000 \times g、5 分間で遠心分離を行い、有機層を採取して合併した。これをもう一度行

い、計 3 回有機溶媒で抽出し合併した。合併したブタノール層を遠心エバポレーターにより乾固させ、得られた白色粉末 tolaasin C を 4°C で保管した。

K3-5 株培養液 2mL を 10,000×g、5 分間、4°C で遠心分離を行い、得られた菌体を PBS で 2 回洗浄を行った。洗浄後の菌体を分光光度計で OD_{600nm} を測定した後、PBS で OD_{600nm} を 4 になるように希釈し、これを菌体懸濁液とした。上記で tolaasin C を、20 mg/mL になるように 40%メタノールで溶解した。Tolaasin C 溶液 10μL を菌体懸濁液 120μL に添加し、2 時間、25°C でインキュベートした。その後、10,000×g、5 分で遠心分離を行い、上清 120μL を回収した。回収した上清に 80μL のメタノールを添加し、DISMIC-03CP 0.45μm フィルターに通した後、HPLC 分析に供した。また、対照区として、PBS に tolaasin C 溶液を同様に添加して、2 時間インキュベート後、10μL 抜き取った後、80μL のメタノールを添加したものを使用した。

2. 結果および考察

2-1 培養液による上清中の tolaasin 除去活性評価

K3-5 株培養液に精製 tolaasin 溶液を添加すると上清中の tolaasin I が約 75% 除去された。この結果より、先行研究での生物検定による tolaasin 解毒は、機器分析における実際の tolaasin I の除去と関連した。さらに K3-5 株と同じグラム陽性細菌である *B. subtilis* JCM 1465 株と 24 時間培養後の培養液の OD_{600nm} の値はほとんど差異が無い一方で、K3-5 株が顕著に高い tolaasin I 除去活性を示した。このことは、同じグラム陽性細菌間でも tolaasin 除去活性には違いがあり、tolaaasin 除去活性は K3-5 株に特徴的な活性であることが示唆された (図 2-1)。

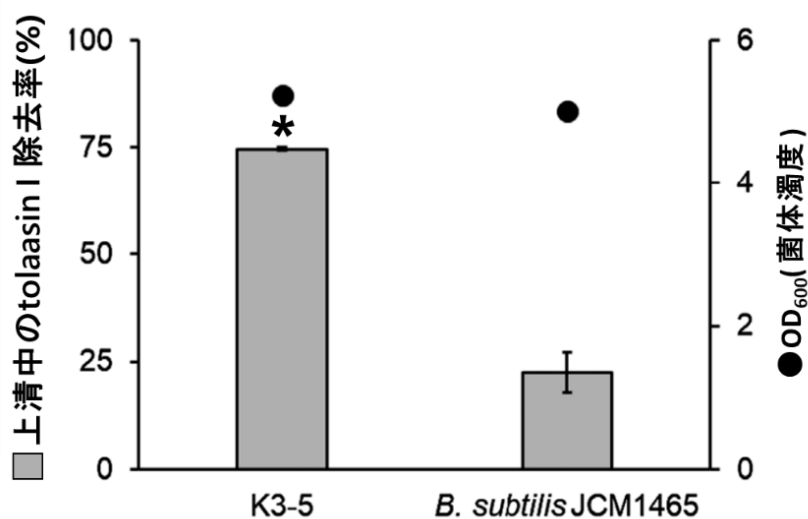


図 2-1 K3-5 株および *B. subtilis* JCM 1465 の培養液処理による tolaasin 除去率および菌体増殖量
平均値 ± 標準誤差 (n=3)。*は有意差あり (Student's T-test $P < 0.01$)。

2-2 Tolaasin 除去因子の局在

Tolaasin 除去因子の局在を調べる為に、培養液を菌体と培養上清に分け、それぞれの tolaasin 除去活性を評価した。その結果、K3-5 株菌体懸濁液は tolaasin 除去率 81.90%を示したのに対し、培養上清では 2.12%であった (図 2-2A)。このことから、K3-5 株は tolaasin を菌体外分泌型酵素ではなく、菌体で tolaasin を除去していることが明らかになった。また、菌体懸濁液処理後のクロマトグラムにおいて、tolaasin I の減少に伴ってリテンションタイム 8min 付近のピークの増加が確認された (図 2-2B)。これは K3-5 株により tolaasin I が分解された分解産物である可能性が示唆された。

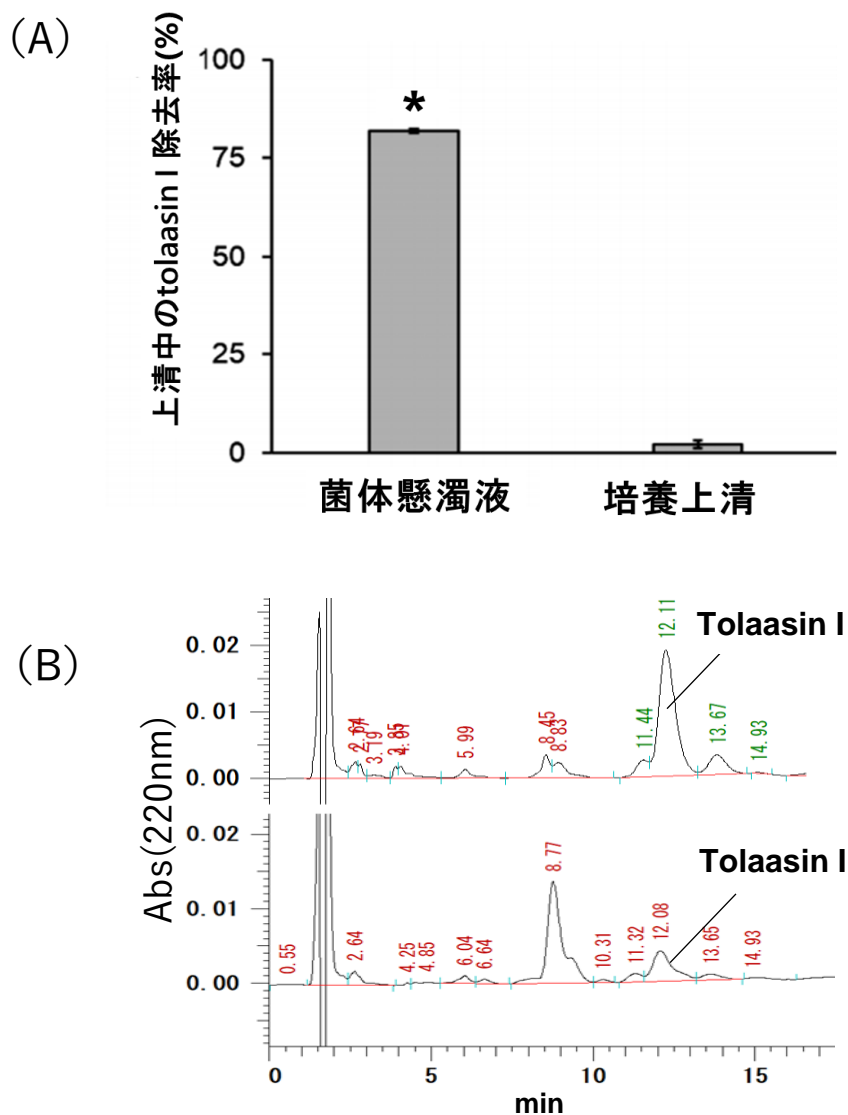


図 2-2 K3-5 株菌体懸濁液および培養上清の tolaasin 処理後上清の HPLC 解析

(A) K3-5 菌体懸濁液および培養上清による tolaasin 除去率および菌体増殖量。平均値 ± 標準誤差 (n=3)。*は有意差あり (Student's T-test, $P < 0.01$)。 (B) HPLC クロマトグラム。(上) 精製 tolaasin のみ (下) K3-5 菌体懸濁液処理後精製 tolaasin。

2-3 Tolaasin 分解箇所の特定

2-2 で菌体懸濁液処理後の上清における HPLC クロマトグラム上に未同定ピークが検出された。このピークを特定するために、LC-MS による質量分析を行った。その結果、tolaasin I の環状構造が開環した構造をもつ tolaasin C の分子量と同じ分子量と推定される m/z 1003.58 が検出された (図 2-3)。他の tolaasin 類縁体と思われるマススペクトルも未処理区で検出され、菌体処理区において各 tolaasin 類縁体ピークが約 4 分の 1 に減少した。さらに、tolaasin 類縁体の環状部分が加水分解を受けた m/z の値と一致するマススペクトルが検出された。つまり、K3-5 株は tolaasin の環状構造を加水分解により開環していることが明らかとなった。

環状リポペプチド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 (D'Costa et al., 2012; Hoefler et al., 2012)。K3-5 株の 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、菌体外分泌型ではなく、K3-5 株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。

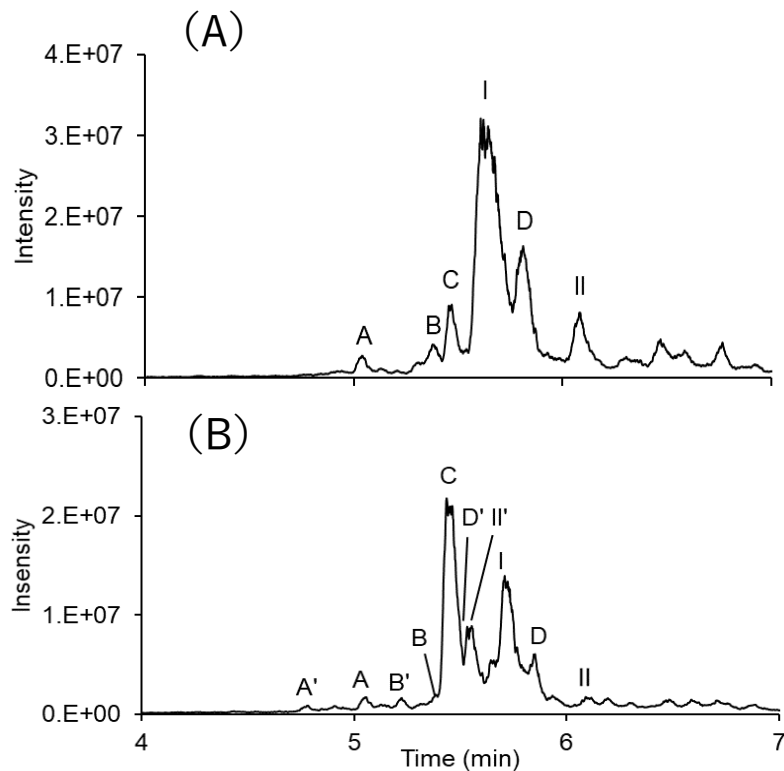


図 2-3 LC-MS クロマトグラム (TIC)

(A) 精製 tolaasin のみ。マス(m/z)はそれぞれ A: 980 B: 987 C: 1003 I: 994 D: 994 II: 972。(B) K3-5 菌体処理後 tolaasin。マス(m/z)はそれぞれ、II': 981 A: 989 B: 996 D: 1003。

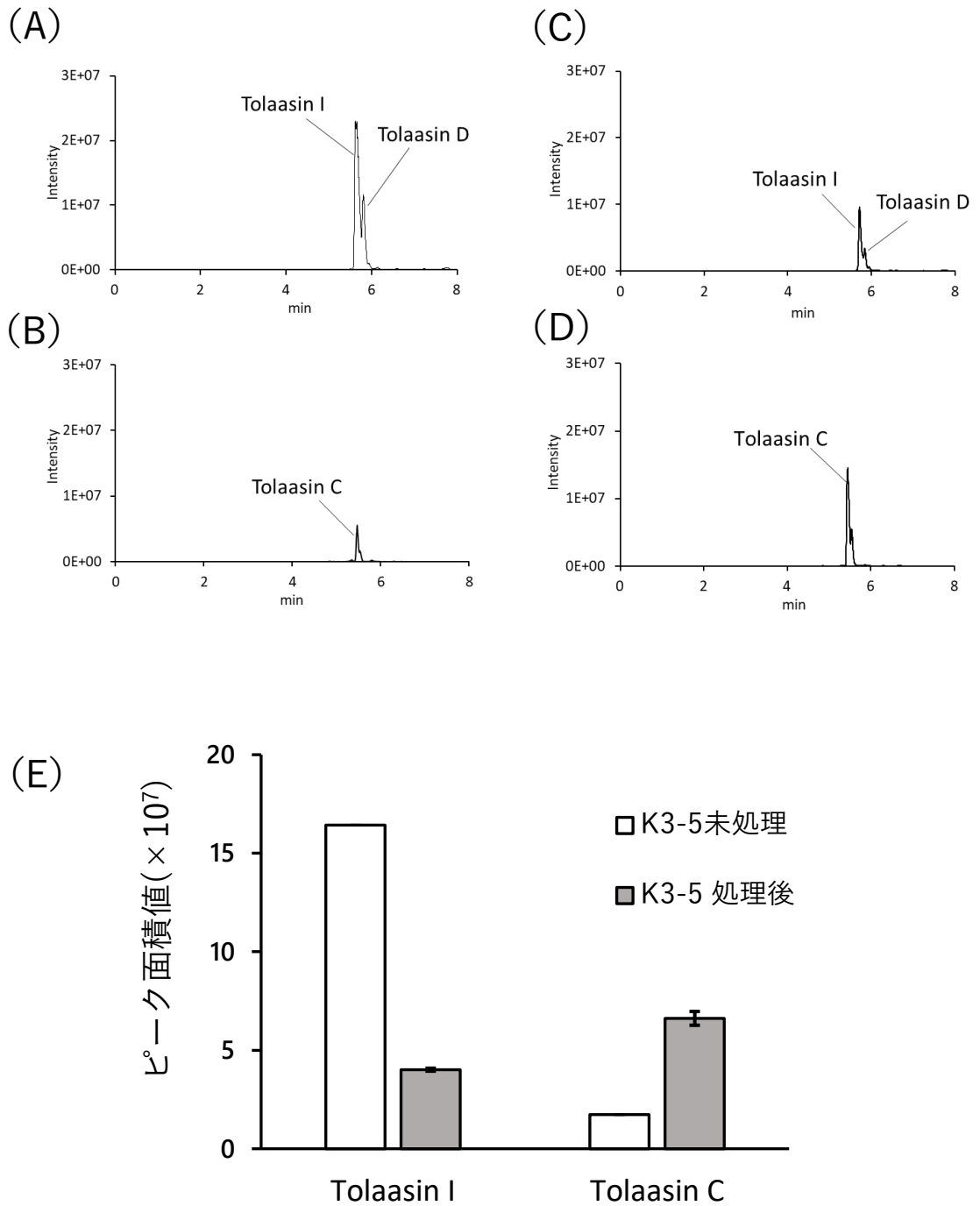


図 2-4 LC-MS クロマトグラム:SIR mode at m/z 994, 1003

(A) m/z 994: K3-5 菌体懸濁液未処理 tolaasin。 (B) m/z 1003: K3-5 菌体懸濁液未処理 tolaasin。 (C) m/z 994: K3-5 菌体懸濁液処理後 tolaasin (D) m/z 1003: K3-5 菌体処理後 tolaasin。 (E) tolaasin I および tolaasin C ピーク面積値。平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

2-4 ジャガイモ塊茎切片を用いた tolaasin 解毒活性評価

K3-5 株により生成された tolaasin C の毒性が実際に失われているかを評価するために、tolasin の K3-5 株菌体懸濁液処理後上清によるジャガイモ塊茎切片を用いた tolaasin 解毒活性試験を行った。精製 tolaasin は 20、10、5 μ M においてジャガイモ塊茎を褐変させた。したがって、最小褐変濃度は 5 μ M であった(図 2-5A)。対照区においては 128 倍希釈区で褐変が見られなくなったことから、64 倍希釈区が最小の褐変濃度となり、解毒試験で得られた対照区に含まれる残存 tolaasin 濃度は 320 μ M となった。菌体処理後の試験区においては 32 倍希釈区で褐変が見られなくなり、16 倍希釈区が最小の褐変濃度となったことから、試験区に含まれる残存 tolaasin 濃度は 80 μ M となった。その結果、K3-5 株菌体懸濁液処理後では tolaasin 解毒率が 75%となった (図 2-5BC)。

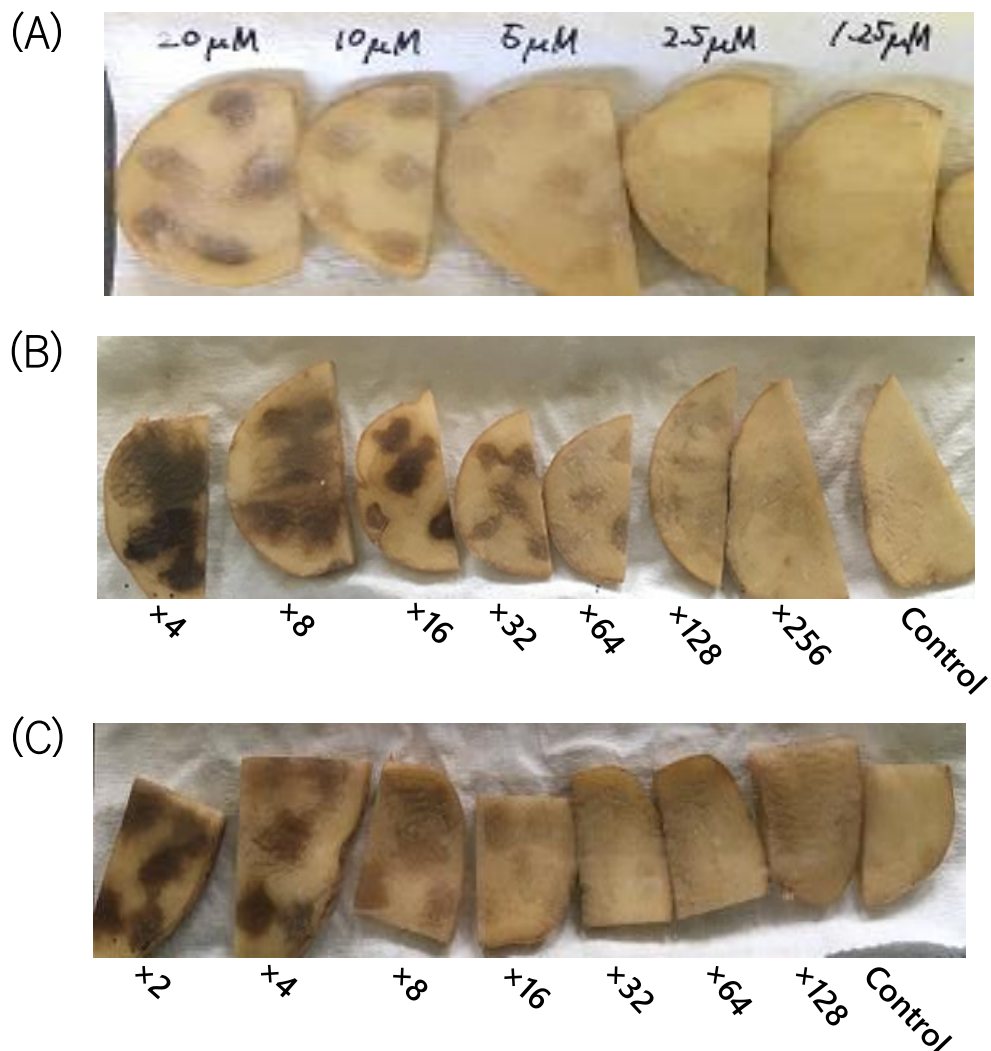


図 2-5 ジャガイモ塊茎切片を用いた生物検定

(A)精製 tolaasin 溶液の最小毒素活性濃度。 (B)対照区:PBS に溶解した精製 tolaasin。 (C) 試験区: K3-5 菌体処理後 tolaasin。 Control は 40%メタノール。

2-5 *Flammulina velutipes* 1203A に対する抗真菌活性評価

K3-5 株により生成された tolaasin C の毒素活性が実際に失われているかを評価するために K3-5 株菌体処理後上清を用いてエノキタケ (*Flammulina velutipes* 1203A) に対する抗真菌活性試験を行った。精製 tolaasin 溶液では、最小で 5 μ M において抗真菌活性を示した。これは前項のジャガイモ塊茎切片の結果とも一致したため、5 μ M を MIC とした(図 2-6A)。今回、対照区において 64 倍希釈区で最小の毒素活性濃度となったことから、解毒試験で得られた対照区に含まれる残存 tolaasin 濃度は 320 μ M となった。菌体処理後の試験区においては 16 倍希釈により、最小の毒素活性濃度となったことから、試験区に含まれる残存 tolaasin 濃度は 80 μ M となった。その結果、tolaasin の K3-5 株菌体懸濁液処理 tolaasin 解毒率が 75% となり、ジャガイモ塊茎切片の結果と一致した(図 2-6B)。このことから、tolaasin 解毒能について、ジャガイモ塊茎切片とエノキタケ間での生物間差はなく、K3-5 菌体懸濁液処理により tolaasin の毒素活性が失われていることが明らかになった。

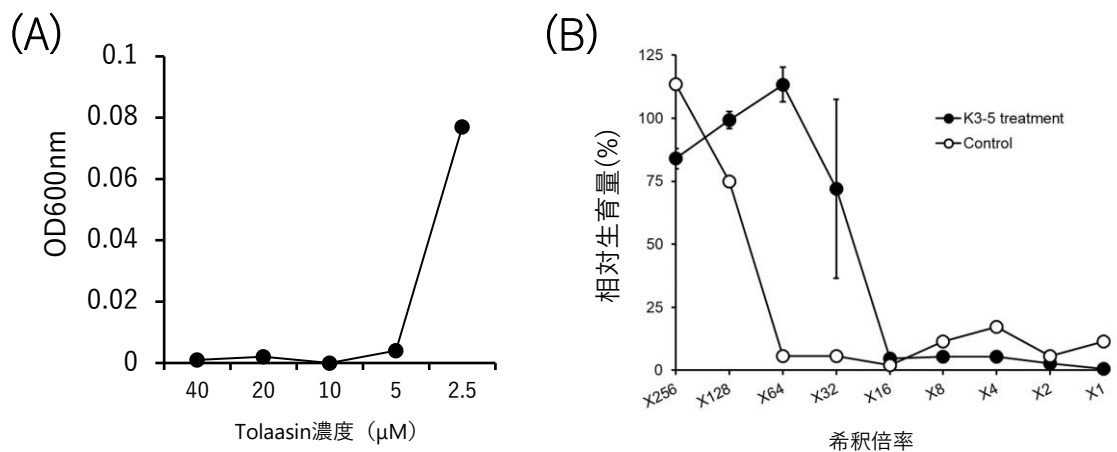


図 2-6 *Flammulina velutipes* 1203A に対する抗真菌活性

(A) 精製 tolaasin 溶液の最小毒素活性濃度。(B) K3-5 株処理後上清と未処理におけるエノキタケに対する抗真菌活性評価。Tolaasin 未接種時の *F. velutipes* の OD_{600nm} の値を 100% とした時の、各試験区における生育を示した。平均値 ± 標準誤差 (n=3)

2-6 Tolaasin C 除去活性評価

K3-5 株菌体懸濁液の上清中の tolaasin C 除去率は 10.83%であり、上清中の tolaasin I 除去率 81.90%と比較して顕著に低い結果となった（データ未掲載）。この結果から tolaasin I の環状構造が本菌株の菌体への結合に重要であることが明らかになった。

Bassarello ら（2004）は tolaasin 類縁体 7 種を精製し、真菌および細菌類に対する抗菌活性評価を行った。その結果、環状構造を有する tolaasin I、II、A、B、D、E は真菌とグラム陽性細菌に対して生育阻害活性を示す一方で、tolaaasin C は全菌種に対して抗菌活性を示さないことを報告した。このことから tolaasin の環状構造は細菌細胞との相互作用において重要な役割を果たすことが考えられる。以上、K3-5 株による tolaasin 解毒機構において、菌体へ tolaasin I が結合後、環状構造が加水分解により開環することで、tolaaasin C が菌体への結合活性を失い、上清中に移行することが推察された。

3. 要約

Microbacterium sp. K3-5 (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 株培養液へ 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 株の 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-MS により分析したところ、tolaasin I 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、開環した生成産物である tolaasin C が同定された。K3-5 株菌体処理による tolaasin 解毒能をジャガイモ塊茎切片の褐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、K3-5 株による tolaasin 解毒は、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。

他の cLP の生分解機構はこれまでにいくつか報告例があるが、いずれも細菌由来の分泌型の分解酵素で環状構造を加水分解し開環するものである。K3-5 株の 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、菌体外分泌型ではなく、K3-5 株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。

第3章

Microbacterium 属基準菌株による tolaasin 解毒能比較

序文

前章で *Microbacterium* sp. K3-5 が他の属と比較して高い tolaasin 解毒能を有することを明らかにした。この結果から、高い tolaasin 解毒能は *Microbacterium* 属に共通した特徴であるのか、またその解毒機構は同様であるのかに興味を持たれる。さらに、K3-5 株よりもさらに高い tolaasin 解毒能を有する種が存在するならば、きのこ腐敗病に対する生物防除剤としての利用にむけて重要であると考えた。本章では、*Microbacterium* 属基準株 30 菌株を対照として tolaasin 解毒能を評価し、さらにその解毒機構について明らかにすることを目的とした。

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

本学農学科篠原教授により分譲された *Pseudomonas tolaasii* 814 株を tolaasin 精製の際に用いた。また、きのこ子実体から分離され、前章において tolaasin 解毒機構について明らかにした *Microbacterium* sp. K3-5 株および *Microbacterium* 属基準菌株 30 菌株を供試菌株として用いた。これら全ての供試菌株は表 3-1 に示した。また供試菌株は使用までグリセロールストックとして-80°Cで保存した。

表 3-1 使用菌株

Strain	Abbreviation	Reference
<i>Pseudomonas tolaasii</i> 814		
<i>Microbacterium</i> sp. K3-5	K3-5	(横田ら, 2018)
<i>M. aerolatum</i> NBRC 103071 ^T	<i>aerolatum</i>	(Zlamala et al., 2002)
<i>M. arborescens</i> NBRC 3750 ^T	<i>arborescens</i>	(Imai et al., 1984)
<i>M. aurantiacum</i> NBRC 15234 ^T	<i>aurantiacum</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998a)
<i>M. aurum</i> NBRC 15204 ^T	<i>aurum</i>	(Yokota et al., 1993)
<i>M. awajiense</i> NBRC 103565 ^T	<i>awajiense</i>	(Kageyama et al., 2008)
<i>M. barkeri</i> NBRC 15036 ^T	<i>barkeri</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998b)
<i>M. chocolatum</i> NBRC 3758 ^T	<i>chocolatum</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998a)
<i>M. deminutum</i> NBRC 101278 ^T	<i>deminutum</i>	(Kageyama et al., 2006)
<i>M. dextranolyticum</i> NBRC 14592 ^T	<i>dextranolyticum</i>	(Yokota et al., 1993)
<i>M. flavum</i> NBRC 103923 ^T	<i>flavum</i>	(Kageyama et al., 2007a)
<i>M. foliorum</i> NBRC 103072 ^T	<i>foliorum</i>	(Behrendt et al., 2001)
<i>M. gubbeenense</i> NBRC 103073 ^T	<i>gubbeenense</i>	(Brennan et al., 2001)
<i>M. hominis</i> NBRC 15708 ^T	<i>hominis</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998a)
<i>M. hydrocarbonoxydans</i> NBRC 103074 ^T	<i>hydrocarbonoxydans</i>	(Schippers et al., 2005)
<i>M. imperiale</i> NBRC 12610 ^T	<i>imperial</i>	(Steinhaus, 1941)
<i>M. keratanolyticum</i> NBRC 13309 ^T	<i>keratanolyticum</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998b)
<i>M. ketosireducens</i> NBRC 14548 ^T	<i>ketosireducens</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998a)
<i>M. kitamiense</i> NBRC 16414 ^T	<i>kitamiense</i>	(Matsuyama et al., 1999)
<i>M. liquefaciens</i> NBRC 15037 ^T	<i>liquefaciens</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998b)
<i>M. luteolum</i> NBRC 15074 ^T	<i>luteolum</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998b)
<i>M. marinilacus</i> NBRC 104188 ^T	<i>marinilacus</i>	(Kageyama et al., 2007b)
<i>M. maritipicum</i> NBRC 15779 ^T	<i>maritipicum</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998a)
<i>M. oleivorans</i> NBRC 103075 ^T	<i>oleivorans</i>	(Schippers et al., 2005)
<i>M. oxydans</i> NBRC 15586 ^T	<i>oxydans</i>	(Schumann et al., 1999)
<i>M. paraoxydans</i> NBRC 103076 ^T	<i>paraoxydans</i>	(Laffineur et al., 2003)
<i>M. phyllosphaerae</i> NBRC 103077 ^T	<i>phyllosphaerae</i>	(Behrendt et al., 2001)
<i>M. resistens</i> NBRC 103078 ^T	<i>resistens</i>	(Behrendt et al., 2001)
<i>M. saperdae</i> NBRC 15038 ^T	<i>saperdae</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998b)
<i>M. schleiferi</i> NBRC 15075 ^T	<i>schleiferi</i>	(Schleifer et al., 1983)
<i>M. testaceum</i> NBRC 12675 ^T	<i>testaceum</i>	(Takeuchi & Hatano, 1998b)

1-2 Tolaasin 精製

本章では tolaasin 精製をより少ないステップで可能にするためのプロトコルを新たに確立した。1L の King's B 液体培地 (1% グリセロール, 2% Proteose peptone, 0.15% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15% K_2HPO_4) で *P. tolaasii* 814 株を 25°C、2 日間振とう培養後、遠心分離 (8,000×g, 10 分間) により培養上清を得た。弱陽イオン性交換樹脂 200g (DIAION WK11, Mitsubishi Chemical) を培養上清 1L に加え、1 時間、130rpm でインキュベートした。インキュベート後、デカントにより上清を捨て、500mL のメタノールにて樹脂を 2 度洗浄した。洗浄後、1%ギ酸を含むメタノール溶液 500mL を樹脂に加えることで tolaasin を溶出し、溶出液をロータリーエバポレーター (東京理化学器械) で濃縮後、10mL の 50% (v/v) メタノールで再溶解後、ODS ゲルカラムクロマトグラフィーに供した (Purif-pack ODS 100 μm SIZE: 60, 昭光サイエンティフィック)。500mL の 50%(v/v)メタノールで洗浄後、500mL の溶出液 (1%(v/v)ギ酸入りメタノール) で溶出後、および、遠心エバポレーター (VC-36R, タイテック) で乾固し、得られた白色粉末を 4°C で保管した。

1-3 HPLC 分析条件

HPLC 分析は 2 章 1-3 と同条件で行った。

1-4 上清中の tolaasin 除去活性試験

1-4-1 培養液

供試菌株を King'sB 平板培地 (寒天 1.5%) にストリークし、25°C、48 時間静置培養を行った。その後、シングルコロニーを King'sB 液体培地 2mL に接種し、25°C、24 時間、130rpm で振盪培養を行った。培養後、各培養液の濁度を $\text{OD}_{600\text{nm}}$ で測定し、培養液 120 μL に tolaasin (20mg/mL) を 10 μL 添加して、ボルテックで攪拌後、25°C、4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000×g、10 分間遠心分離を行い、上清 120 μL を回収し、メタノール 80 μL を加え (終濃度 40%) 0.45 μm セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP 0.45 μm , アドバンテック東洋) に通した後、HPLC 分析に供した。

1-4-2 菌体懸濁液および培養上清

被試験菌培養液を 10,000×g、5 分間遠心分離を行い、菌体と培養上清に分離した。菌体は Phosphate buffered saline (PBS, 10 mM phosphate-Na bufer pH 6.8, 140 mM NaCl) で洗浄後、PBS で $\text{OD}_{600\text{nm}}=4$ に調製し、菌体懸濁液とした。培

養上清は 0.45 μ m セルロースアセテートフィルター(DISMIC-25CS, 0.45 μ m アドバンテック東洋)でろ過した。菌体懸濁液もしくは培養上清を 2mL チューブに 120 μ L 分注し、tolaasin (20mg/mL) を 10 μ L 添加して、ボルテックスで攪拌後、25 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000 \times g、10 分間遠心分離を行い、上清 120 μ L を回収し、メタノール 80 μ L を加え(終濃度 40%)、tolaasin I 量を HPLC で測定した。また、Control として King'sB 液体培地に精製 tolaasin 溶液を同様に添加したものをを用いた。

1-5 ジャガイモ塊茎切片を用いた生物検定

液体振盪培養により得られた培養液を 10,000 \times g、10 分間遠心分離を行って菌体を回収し、PBS で洗浄した。菌体を PBS で OD_{600nm}=4 に調製し菌体懸濁液とした。菌体懸濁液 195 μ L を 2mL チューブに取り、tolaasin (20mg/mL) 5 μ L を加え、30 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000 \times g、5 分間の遠心分離で菌体を回収し、PBS で洗浄後、200 μ L の PBS に懸濁し、tolaasin 処理菌体懸濁液とした。 tolaasin 処理菌体懸濁液を PBS で適宜、希釈し、検定に用いた。厚さ 5mm 程度に薄切りしたジャガイモ塊茎切片に、tolaasin 処理菌体懸濁液 10 μ L を切片 1 枚につき 2 箇所、合計 6 箇所に滴下した。25 $^{\circ}$ C、24 時間静置培養後の褐変を目視で確認し、褐変を示した最大希釈倍率の Log2 の値を tolaasin の毒素活性とし、Control には PBS に tolaasin を添加し 4 時間後のものを用いたものを使用した。Control と比較して毒素活性を評価した。

1-6 きの子実体を用いた生物検定

foliorum と *paraoxydans* の菌体懸濁液を 1-5 と同様の方法で調整し、菌体懸濁液 195 μ L を 2mL チューブに取り、精製 tolaasin 溶液 (20mg/mL) 5 μ L を加え、30 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベートを行った。インキュベート後、10,000 \times g、5 分間の遠心分離で菌体を回収し、PBS で洗浄後、200 μ L の PBS に懸濁し、tolaasin 処理菌体懸濁液とした。厚さ 10mm 程度に薄切りしたマッシュルーム(*Agaricus bisporus*)子実体切片に tolaasin 処理菌体懸濁液 10 μ L を切片 1 枚につき 2 箇所添加し(切片を 3 枚使用し、6 連とした)、25 $^{\circ}$ C、24 時間静置培養後の褐変を観察した。

1-7 Tolaasin 処理後菌体細胞からの tolaasin I の抽出

上述と同様の方法で調整した *foliorum* と *paraoxydans* の tolaasin 処理菌体懸濁液に 1M NaCl あるいはメタノールを加え 10 分間ボルテックス後 10,000 \times g、10 分間の遠心分離にて上清を回収した。得られた上清をロータリーエバポレー

ター (VC-36R, タイテック) で乾固した。乾固後、200 μ L の 40%メタノールに溶解し、DISMIC-03CP 0.45 μ m フィルターに通した後、HPLC 分析に供した。

2. 結果および考察

2-1 上清中の tolaasin 除去活性の比較

Microbacterium 属基準株 30 株において培養液での tolaasin I 除去率は 9.10% から 81.25% となり、菌株間で大きく異なった(表 3-2)。一方で、生育量(OD_{600nm})においても菌株間で大きく異なったことから、基準菌株 30 菌株の tolaasin I 除去率と生育量の相関を解析したところ正の相関 ($r = 0.691$) が確認された(図 3-1)。このことから、tolasin 除去活性は生育量に依存すること、そして *Microbacterium* 属に共通の特徴であることが示唆された。第 2 章で述べたように、K3-5 株による tolaasin 除去活性は菌体に依存しており、培養上清では活性が見られなかった。今回においても、供試菌 30 株の tolaasin 除去活性はすべて菌体に依存しており、培養上清には活性が見られなかった(表 3-2)。菌体懸濁液 ($OD_{600nm}=4$) による tolaasin I 除去率は 53.31% から 85.22% の間となり平均は 74.9% であった。培養液と比較して、tolasin I 除去率の値の変化が菌株間で小さかった結果は、培養液による tolaasin I 除去率と生育量間での正の相関が確認されたことを支持するものとなった(図 3-1)。

第 2 章において、K3-5 株菌体が tolaasin の環状構造を開環し tolaasin C を生産することを明らかにした。しかしながら、tolasin 添加した *Microbacterium* 属基準株 30 株の菌体懸濁液処理後の上清中には tolaasin C の増加は確認されなかった。

表 3-2 *Microbacterium* 属基準株 30 株による tolaasin 除去活性

菌株	Tolaasin I 除去率 (%)			
	培養液	OD _{600nm}	菌体懸濁液	培養上清
<i>aerolatum</i>	61.24 ± 1.37 abcdef	2.94	75.12 ± 0.72 cdefg	N.D.
<i>Arborescens</i>	59.36 ± 0.23 abcdef	6.18	76.44 ± 0.63 cdefg	N.D.
<i>aurantiacum</i>	75.83 ± 0.72 abc	7.93	84.14 ± 0.92 ab	N.D.
<i>aurum</i>	47.60 ± 3.70 fgh	3.76	72.82 ± 1.79 efgh	N.D.
<i>Awajiense</i>	67.04 ± 2.93 abcdef	18.03	53.31 ± 1.52 k	N.D.
<i>barkeri</i>	62.18 ± 1.48 abcdef	10.73	72.45 ± 0.71 efgh	N.D.
<i>chocolatum</i>	47.49 ± 10.56 fgh	3.63	61.92 ± 2.81 j	N.D.
<i>dextranolyticum</i>	51.39 ± 5.45 defgh	6.31	80.60 ± 1.10 abcd	N.D.
<i>flavum</i>	61.00 ± 1.92 abcdef	7.23	78.71 ± 1.14 abcdef	N.D.
<i>foliorum</i>	54.95 ± 2.11 bcdefgh	3.61	85.22 ± 2.08 a	N.D.
<i>gubbeenense</i>	81.25 ± 1.28 a	9.22	76.20 ± 0.74 cdefg	N.D.
<i>hominis</i>	77.30 ± 0.65 ab	9.46	79.53 ± 0.90 abcde	N.D.
<i>hydrocarbonoxydans</i>	72.83 ± 0.94 abcde	8.14	79.50 ± 0.42 abcde	N.D.
<i>imperiale</i>	72.14 ± 0.96 abcde	11.51	72.58 ± 2.82 efgh	N.D.
<i>keratanolyticum</i>	67.38 ± 2.62 abcdef	7.42	82.10 ± 0.92 abc	N.D.
<i>ketosireducens</i>	74.34 ± 12.04 abcd	6.57	81.54 ± 1.85 abc	N.D.
<i>kitamiense</i>	49.72 ± 3.15 efgh	8.83	76.68 ± 0.37 cdefg	N.D.
<i>laevaniformans</i>	30.00 ± 1.46 hij	2.39	80.94 ± 1.62 abcd	N.D.
<i>liquefaciens</i>	51.52 ± 0.99 defgh	7.74	72.32 ± 0.92 efgh	N.D.
<i>luteolum</i>	52.13 ± 1.94 defgh	6.37	81.50 ± 1.22 abc	N.D.
<i>marinilacus</i>	56.44 ± 2.35 bcdefg	4.87	74.05 ± 0.29 defgh	N.D.
<i>Maritypicum</i>	9.10 ± 3.13 j	0.87	70.97 ± 0.88 ghi	N.D.
<i>oleivorans</i>	35.85 ± 8.31 ghi	1.27	64.38 ± 0.60 ij	N.D.
<i>oxydans</i>	44.43 ± 10.39 fghi	6.41	76.96 ± 0.88 bcdefg	N.D.
<i>paraoxydans</i>	52.99 ± 4.02 cdefgh	6.20	74.95 ± 0.62 cdefgh	N.D.
<i>phyllosphaerae</i>	23.19 ± 3.08 ij	0.79	74.97 ± 0.85 cdefg	N.D.
<i>resistens</i>	66.59 ± 1.34 abcdef	9.33	74.06 ± 1.14 defgh	N.D.
<i>saperdae</i>	58.78 ± 0.67 abcdefg	6.68	72.95 ± 0.94 cdefg	N.D.
<i>schleiferi</i>	62.62 ± 0.99 abcdef	8.50	67.58 ± 0.84 hij	N.D.
<i>testaceum</i>	54.90 ± 5.76 bcdefg	6.95	72.03 ± 2.66 fgh	N.D.

平均値 ± 標準誤差 (n=3)。同一アルファベット間に有意差なし(Tukey 法、 $P < 0.05$)。OD600 は各菌株培養液の OD600 を示した。N.D は未検出。

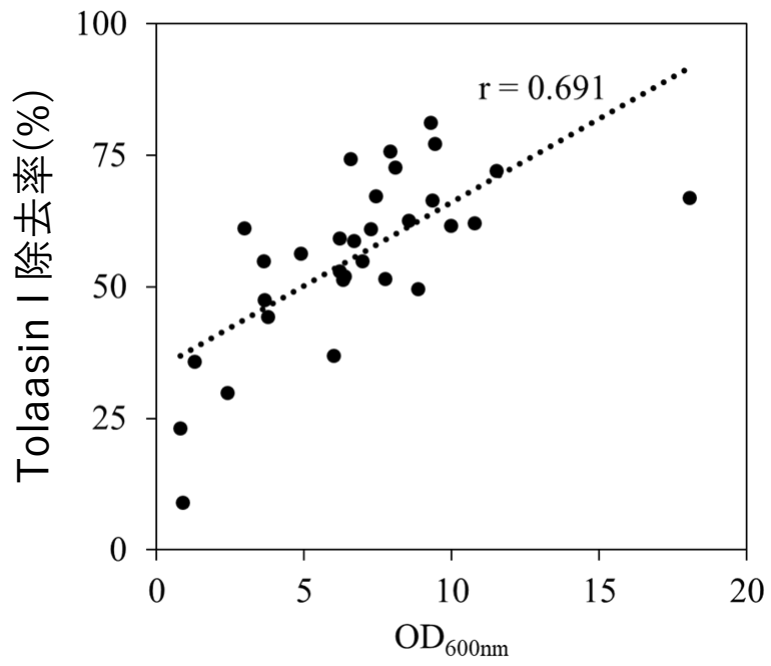


図 3-1 供試菌株培養液の tolaasin I 除去率(%)と OD_{600nm} の相関図

2-2 ジャガイモ塊茎切片による tolaasin 解毒活性評価

予想に反し、*foliorum*を除くほとんどの菌株では tolaasin を処理した菌体に毒素活性が認められた(表 3-3)。毒素活性の値は、0 から 6.3 となり、毒素活性と菌体懸濁液による上清中の tolaasin I 除去率の間には負の相関 ($r=0.131$)が確認された(図 3-2)。K3-5 株菌体処理後の毒素活性は他の供試菌株と比較して顕著に低い値を示したが、*foliorum* が最も効果的な tolaasin 解毒活性を示した(表 3-3)。

Microbacterium 属の殆どの菌株は、toलाasin をその菌体に吸着して、上清中から除去するものの、菌体に吸着した tolaasin は必ずしも解毒される訳ではないことが明らかになった。一方で、既に解毒機構を報告した K3-5 株を含む数菌株については顕著な解毒活性が認められ、とりわけ、*foliorum* では高い解毒活性が認められた。Tolaasin はグラム陽性菌に対して生育阻害活性を示すため(Bassarello et al., 2004)、グラム陽性菌である本属の菌体に吸着することは十分に理解できる。しかし、菌体へ吸着した tolaasin がなぜジャガイモ塊茎切片を褐変するかについては不明である。

表 3-3 *Microbacterium* 属基準菌 30 株の tolaasin 処理した菌体によるジャガイモ塊茎切片を指標とした毒素活性

菌株	毒素活性
<i>aerolatum</i>	4.83 ± 0.43 bcdefg
<i>arborescens</i>	6.00 ± 0.37 abc
<i>aurantiacum</i>	5.83 ± 0.24 abcd
<i>aurum</i>	5.33 ± 0.70 abcde
<i>Awajiense</i>	4.83 ± 0.43 bcdefg
<i>barkeri</i>	3.00 ± 0.52 hi
<i>chocolatum</i>	5.17 ± 0.43 abcdef
<i>dextranolyticum</i>	4.83 ± 0.43 bcdefg
<i>flavum</i>	5.67 ± 0.30 abcd
<i>foliorum</i>	0.00 ± 0.00 j
<i>gubbeenense</i>	5.33 ± 0.30 abcde
<i>hominis</i>	5.83 ± 0.24 abcd
<i>hydrocarbonoxydans</i>	5.00 ± 0.00 abcdef
<i>imperiale</i>	6.17 ± 0.43 ab
<i>keratanolyticum</i>	5.17 ± 0.24 abcdef
<i>ketosireducens</i>	4.50 ± 0.32 defg
<i>kitamiense</i>	4.50 ± 0.32 defg
<i>laevaniformans</i>	4.50 ± 0.32 defg
<i>liquefaciens</i>	5.33 ± 0.30 abcde
<i>luteolum</i>	5.33 ± 0.30 abcde
<i>marinilacus</i>	5.00 ± 0.52 abcdef
<i>Maritypicum</i>	4.67 ± 0.47 cdefg
<i>oleivorans</i>	5.17 ± 0.43 abcdef
<i>oxydans</i>	3.50 ± 0.48 ghi
<i>paraoxydans</i>	6.33 ± 0.30 a
<i>phyllosphaerae</i>	5.67 ± 0.47 abcd
<i>resistens</i>	4.67 ± 0.30 cdefg
<i>saperdae</i>	3.83 ± 0.24 fgh
<i>schleiferi</i>	4.00 ± 0.00 efgh
<i>testaceum</i>	4.50 ± 0.32 defg
K3-5	2.33 ± 0.79 i

平均値 ± 標準誤差 (n=6)。同一アルファベット間に有意差なし(Tukey 法、 $P < 0.05$)。

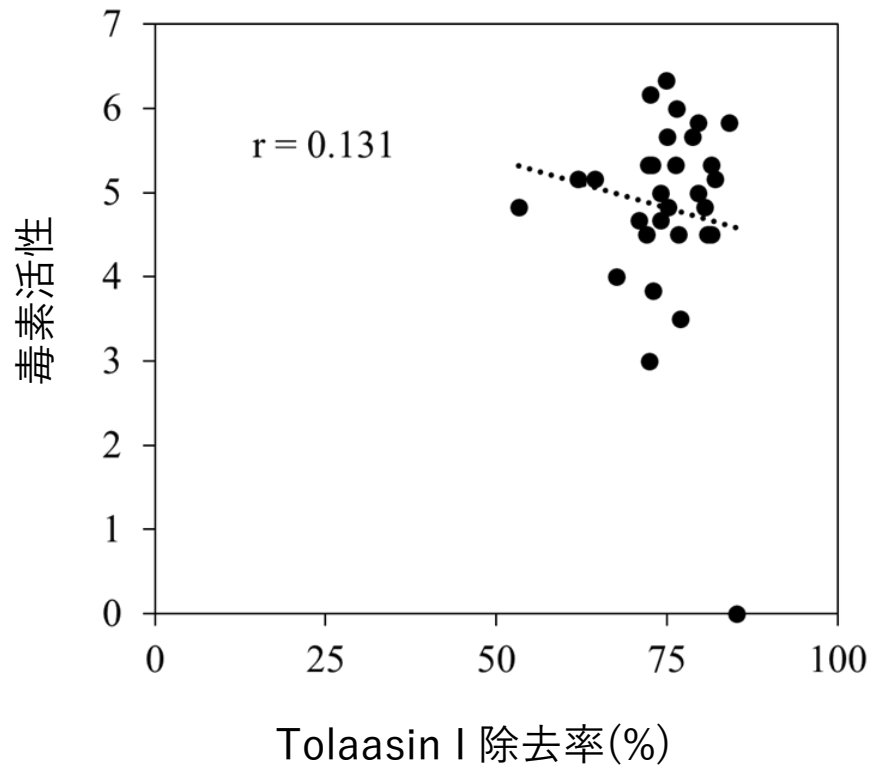


図 3-2 供試菌株菌体懸濁液の tolaasin I 除去率(%)と毒素活性の相関図

2-3 きの子実体による tolaasin 解毒活性評価

foliorum と *paraoxydans* 菌体処理した tolaasin の毒素活性を、ブラウンマッシュルーム子実体切片を用いて評価した。PBS に懸濁した 0.5mg/mL の精製 tolaasin 溶液 10 μ L を添加した子実体切片は黒変が確認されたが (図 3-3B)、PBS のみのバッファーコントロールにおいて黒変は確認されなかった(図 3-3A)。菌体処理した試験区においては、*paraoxydans* 菌体のみでは黒変を示さないにも関わらず、処理した tolaasin において、子実体上での黒変が確認された (図 3-3D)。一方で、*foliorum* 菌体処理においては、子実体の黒変は一切確認されなかった (図 3-3C)。これらのブラウンマッシュルーム子実体上での結果は、前項のジャガイモ塊茎切片の結果と類似していた。

Tsukamoto ら (2002) は食用きのこから tolaasin 解毒活性を有する様々な細菌株を分離した。しかしそれらは tolaasin 処理後の菌体を取り除いた上清を用いてジャガイモ塊茎切片での評価を行ったものであり、本項での結果から、Tsukamoto らの評価方法は tolaasin 解毒細菌を評価する上で不十分であることを示した。



図 3-3 ブラウンマッシュルーム子実体上での tolaasin 毒素活性

(A) Buffer コントロール(PBS)、(B) 精製 tolaasin のみ、(C) *foliorum* 菌体処理後 tolaasin、(D) *paraoxydans* 菌体処理後 tolaasin。

2-4 Tolaasin 処理した菌体からの tolaasin 回収

Microbacterium 属細菌がどのような様式で tolaasin を吸着しているかを明らかにするために、1M NaCl およびメタノールを用いて tolaasin 処理後菌体から tolaasin の回収を試みた。その結果、1M NaCl 処理によって、tolaaasin 処理した *paraoxydans* 菌体から完全な tolaasin I が抽出された (図 3-4C)。Yang ら(2017)は、tolaaasin と同じ陽イオン性リポペプチドである brevibacillin の *Straphylococcus aureus* 菌体への相互作用をリポテイコ酸(LTA)精製物の添加によって阻害されることを報告した。本項において tolaasin I が NaCl 溶液によって菌体から抽出されたことから、筆者は陽イオン性である tolaasin がイオン結合によって LTA を含む陰イオン性の細胞構成成分に吸着していると推察した。さらに、tolaaasin 処理した *paraoxydans* 菌体からメタノール処理によっても抽出された(図 3-4B)。

Microbacterium 属の多くの菌株において、1M NaCl と比べてメタノール処理の方が tolaasin の抽出量が大きかった(図 3-5AB)。この結果は、tolaaasin と菌体間での疎水性相互作用がイオン結合よりも強固であることを示唆した。Brodey (1991)は tolaasin によるウマの赤血球の溶血活性が脂質二重膜でのイオンチャネル形成によって引き起こされることを報告した。また、Jo ら(2011)は in silico モデリングにより、tolaaasin の 8 量体形成により、脂質二重膜を貫通しイオンチャネルを形成することを論証した。しかしながら、本項で tolaasin が菌体の脂質二重膜から抽出されてきたかどうかは不明である。

一方、tolaaasin 処理した *foliorum* 菌体からは 1M NaCl およびメタノールを用いても tolaasin は抽出されなかった (図 3-4DE)。前項で示したように、K3-5 株菌体懸濁液処理によって上清中の tolaasin C 量が増加したが、*foliorum* 菌体処理後の上清中の HPLC 分析においては tolaasin C の増加は確認されなかった。このことから、tolaaasin 解毒機構は *Microbacterium* 属間で異なることが示唆された。

Soler-Rivas ら(2001)は tolaasin が *Agaricus bisporus* 子実体のチロシナーゼ遺伝子の発現を誘導することを報告した。また、Brodey (1991) はアミノ酸 3 残基が欠失した変異 tolaasin は脂質二重膜に対してイオンチャネルを形成することが出来ずきのこ組織への毒素活性が減少することを明らかにした(Brodey, 1991)。これらの知見から、本研究は、tolaaasin は一度吸着した菌体細胞からきのこ子実体へ移行した後に、きのこ組織において膜孔を形成し、子実体の黒変を引き起こす可能性を示唆した。

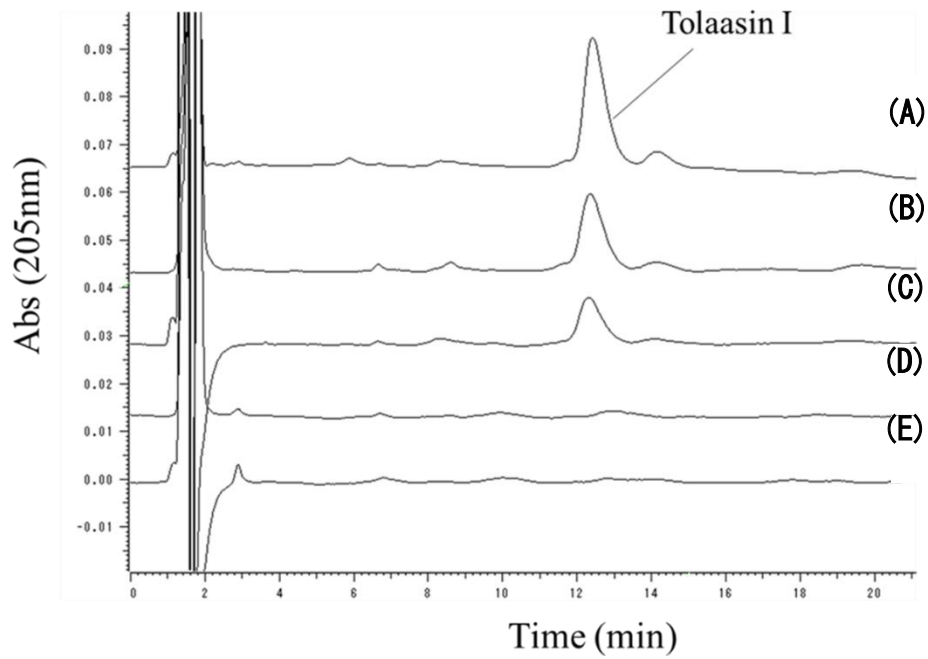


図 3-4 菌体から抽出した tolaasin の HPLC クロマトグラム

(A) 精製 tolaasin, (B) *paraoxydans* 菌体からメタノール抽出物。(C) *paraoxydans* 菌体からの 1 M NaCl 抽出物。(D) *foliorum* 菌体からのメタノール抽出物。(E) *foliorum* 菌体からの 1M NaCl 抽出物。

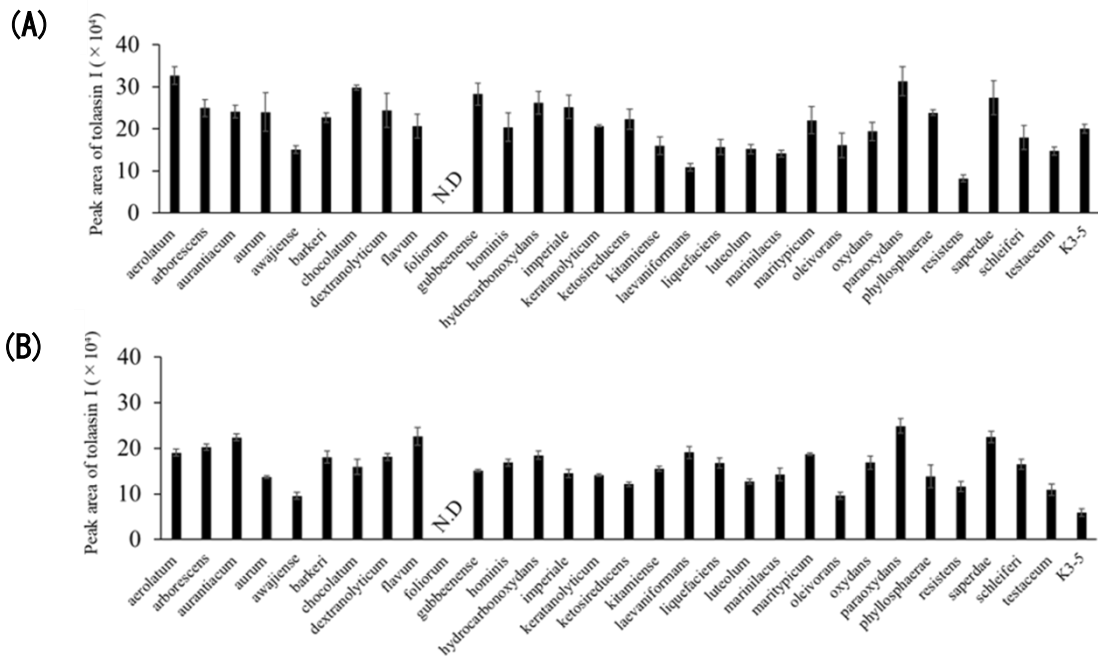


図 3-5 菌体から抽出した tolaasin I ピーク面積値

(A)メタノールによる抽出。(B) 1 M NaCl による抽出。平均値±標準誤差 (n=3)。

3 要約

第3章において K3-5 株による tolaasin 解毒活性およびその機構について明らかにした。本章では、K3-5 株と近縁菌種である *Microbacterium* 属基準株 30 株を用いて tolaasin 解毒能を分析化学的手法および生物検定により評価した。供試した全ての *Microbacterium* 属基準株 30 株の菌体は、K3-5 株と同程度の高い tolaasin 除去活性を示した。しかし、各菌体懸濁液中の菌体を集菌し、ジャガイモ塊茎切片へ接種すると、多くの菌株は顕著な褐変を引き起こした。この現象は、ブラウンマッシュルーム子実体を用いたアッセイにおいても同様に観察された。さらに、これらの tolaasin 処理菌体をメタノールおよび 1 M NaCl で懸濁したところ、完全な tolaasin I が菌体から回収された。以上のことから tolaasin は水溶液中で菌体へ吸着されるが、吸着されてもその毒素活性を菌体上で維持していることを明らかにした。一方、tolaasin 解毒活性を示す *foliorum* の tolaasin 処理菌体からは、tolaasin I は回収されなかった。さらに、K3-5 株菌体懸濁液処理において観察された tolaasin I 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、*foliorum* の tolaasin 解毒機構は新規性が高いことが強く示唆された。

以上、tolaasin の解毒には菌体吸着後の加水分解が必須であることを明らかにした。これまでの国内外の研究では、菌体への tolaasin の吸着特性に着目して候補株が分離されていたため、本章で得られた結果は、既知の方法ではなく、菌体表層での分解活性に基づいて実用的な解毒細菌を選抜出来る点で非常に有用な知見となるものである。

第 4 章

Microbacterium foliorum NBRC 103072^T の tolaasin 解毒様式

序文

前章において、*Microbacterium* 属の基準株 30 株がすべて高い tolaasin 吸着活性を有するにも関わらず、*M. foliorum* NBRC 103072^T (Mf103072) を除くすべての菌株において菌体上で tolaasin の毒性を保持していることが明らかになった。このことから、tolaaasin の菌体への吸着は解毒において不十分であり、tolaaasin 解毒には加水分解が重要であることが示された。しかし、Mf103072 株菌体の tolaasin 処理後上清からは K3-5 株処理で観察された tolaasin C の増加は確認されなかった。このことから、Mf103072 株の tolaasin 分解機構は K3-5 株とは異なることが考えられた。したがって本章では、Mf103072 株の tolaasin 解毒様式について解析を行うこととした。

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

本学農学科篠原教授により分譲された *Pseudomonas tolaasii* 814 株を tolaasin 精製の際に用いた。また、*Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T を tolaasin 解毒細菌として用いた。すべての供試菌株は使用までグリセロールストックとして -80°C で保存した。

1-2 Tolaasin 精製

Tolaasin の精製は *P. tolaasii* 培養液から、第 3 章 1-2 と同様の方法で行った。

1-3 LC-MS 分析条件

LC-MS 解析は Infinity II 1260 HPLC (Agilent Technologies) を用い、検出器には Agilent Infinity Lab LC-MSD を使用した。分析カラムは InertSustain C18 column UP (2.0 μ m, 2.1mm \times 100mm, GL Sciences) を使用し、インジェクション量 1 μ L、流速 400 μ L/min、カラム温度 40°C の条件で行った。溶離液は 0.1 %v/v ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 %v/v ギ酸アセトニトリル溶液 (B 液) を使用し、A 液として 80%(4 分間)、80% \rightarrow 48% (リニアグラジエント 8 分間) の溶出条件で分析した。

1-4 LC-MS/MS 分析条件

LC-MS/MS 解析は 1260 Infinity series-MS/MS 6563 Accurate-MASS Q-TOF LC/MS(Agilent Technologies 社)にて分析した。分析カラムは Inert Sustain AQ-C18 (3 μ m, 1.0 \times 150 mm, GL Sciences)使用し、流速 70 μ L/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C の条件で行った。溶離液は 0.1 %v/v ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 %v/v ギ酸アセトニトリル溶液 (B 液) を使用し、A 液として 70% (1 分間)、70% \rightarrow 0% (リニアグラジエント 12 分間)、0% (2 分間)の溶出条件で分析した。これらのデータ解析は Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis Software (Version B. 06.00)を用いて行った。ACD/ChemSketch (Freeware) ソフトで tolaasin 構造を作成し、同位体分布計算ツールソフトでフラグメントの分子量を出して、LC-MSMS データのフラグメントと照らし合わせることで、tolaasin 分解産物の構造を解析した。

1-5 菌体懸濁液による tolaasin 除去活性試験

Mf103072 株を King'sB 平板培地 (寒天 1.5%) にストリークし、25 $^{\circ}$ C、48 時間静置培養を行った。その後、シングルコロニーを King'sB 液体培地 2mL に接種し、25 $^{\circ}$ C、24 時間、130rpm で振盪培養を行った。培養後 10,000 \times g、5 分間遠心分離を行い、菌体を Phosphate buffered saline (PBS, 10mM phosphate-Na bufer pH 6.8, 140 mM NaCl) で洗浄後、PBS で OD_{600nm}=1 に調製し、菌体懸濁液とした。この菌体懸濁液 120 μ L に 2mg/mL の精製 tolaasin 溶液を 5 μ L 接種し、25 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000 \times g、5 分間遠心分離を行い、上清 120 μ L を回収し、メタノール 80 μ L を加え (終濃度 40%) 0.45 μ m セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP 0.45 μ m, アドバンテック東洋)に通した後、LC-MS 分析に供した。

1-6 菌体からの tolaasin 加水分解酵素抽出

Woude ら (2013)の方法を参考に TritonX-100 を用いて菌体からの tolaasin 加水分解酵素の抽出を試みた。Mf103072 株を King'sB 平板培地 (寒天 1.5%) にストリークし、25 $^{\circ}$ C、48時間静置培養を行った。出現したシングルコロニーを King's B 液体培地 3mL に接種し、25 $^{\circ}$ C、24 時間、130rpm で振盪培養し前培養液とした。前培養液 2.5mL を King'sB 培地 500mL (1L 容羽根つき三角フラスコ) に接種し、25 $^{\circ}$ C、130rpm、24 時間振盪培養した。培養液 500mL を 4 $^{\circ}$ C、10,000 \times g、5min で遠心分離後、上清を捨て、得られた菌体を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) により菌体洗浄を行った。菌体洗浄後、10mL の 0.05、0.1、0.5、1.0、2.0%に調整した Triton X-100 により再懸濁し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和し

た。その後、10,000×g、10min で遠心分離後上清を回収し 0.2μm フィルター (DISMIC-25CS, 0.20μm, アドバンテック東洋) にてろ過を行った。

1-7 酵素抽出液による tolaasin 分解活性試験

115μL の酵素抽出液に 5μL の精製 tolaasin 溶液(2mg/mL)を添加し 25°C、4 時間インキュベートした。インキュベート後メタノール 80μL を加え(終濃度 40%) 0.45μm セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP 0.45μm, アドバンテック東洋) に通した後、LC-MS 分析に供した。

1-8 DNA 抽出および PCR

16S rRNA 遺伝子(16SrDNA)の検出のために、酵素抽出液と菌体破砕液を PCR 法の鋳型 DNA として用いた。Mf103072 株培養液 2mL を 10,000×g、5 分で遠心分離後、PBS で菌体洗浄を行った。菌体洗浄後、再度 10,000×g、5 分間遠心分離を行い、得られた菌体を 0.5% Triton X-100 で溶解 4°C、2 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000×g、5 分間遠心分離を行い、上清を回収し、これを酵素抽出液とした。得られた菌体を PBS で洗浄し、再度 10,000×g、5 分間遠心分離を行い 200μL の PBS で懸濁した。ジルコニアシリカビーズ(0.2mm、バイオメディカルサイエンス)を菌体懸濁液に加え、ビーズ式破砕装置(FastPrep 24 Instrument, フナコシ)により 2 分間で破砕した。破砕後、10,000×g、5 分間遠心分離を行い、上清を回収し、これを菌体破砕液とした。得られた酵素抽出液、菌体破砕液は S.P.W で 1000 倍希釈しこれらを鋳型に PCR 法により 16S rDNA 断片を増幅させた。使用したプライマーは表 4-1 に示した。表 4-2 の組成で反応液の調製を行い、表 4-3 の条件下で PCR を行った。その後 1%アガロースゲル電気泳動により、16S rDNA 断片の増幅を確認した。泳動 buffer には 1×TAE buffer (50 mM Tris-base, 30 mM 酢酸ナトリウム, 3 mM EDTA, 96%酢酸にて pH を 7.9 に調整)を使用した。泳動後のゲルは、エチジウムブロマイド 1μg/mL にて 10 分間染色し、Bio-Rad ChemiDoc XRS+ system (バイオラッド) にて撮影した。

表 4-1 プライマー配列

Primer	Sequence (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT

表 4-2 PCR 反応液

	使用量
10×EX Taq Buffer	2.5 μL
dNTP Mixture	2.0 μL
Primer 27F 10μmol/L	0.5 μL
Primer 1492R 10μmol/L	0.5 μL
Template	0.5 μL
EX Taq DNA polymerase	0.13 μL
Super Pure Water	18.87 μL
Total	25 μL

表 4-3 PCR 条件

	温度	反応時間
1.Initial Denaturation	94°C	5min
2.Denaturation	98°C	10sec
3.Annealing	55°C	30sec
4.Extension	72°C	1.5min
Go to 2-29cycles		—
5.Pause	15°C	Forever

2. 結果および考察

2-1 Mf103072 株による tolaasin 加水分解

第3章において Mf103072 株が高い tolaasin 解毒活性を有するにもかかわらず、K3-5 株で見られた tolaasin の環状構造が開環した tolaasin C の増加が確認されなかったことから、Mf103072 株が新規 tolaasin 解毒機構を有することが考えられた。そこで、精製 tolaasin を Mf103072 株菌体懸濁液による処理を行い、得られた上清の LC-MS 解析により tolaasin 解毒について解析した。LC-MS 解析の結果、菌体懸濁液処理後上清からは、精製 tolaasin のクロマトグラムからは検出されない、新規の 4 つのピークが検出された (図 4-1)。さらにこれら 4 つのピークのマススペクトルを確認したところ、それぞれ m/z 640.0、 m/z 683.3、 m/z 727.3、 m/z 640.3 が主なマススペクトルとして検出された (図 4-2A-D)。このことから、これらの新規ピークは Mf103072 株による tolaasin 分解産物である可能性が高いことから、LC-ESI-MS/MS による構造同定を行うこととした。

LC-ESI-MS/MS により得られたプレカーサーイオン m/z 727.43[M+H]⁺由来のプロダクトイオンスペクトルを図 4-3A に、 m/z 639.91[M+2H]²⁺を図 4-3B に示した。これらのフラグメントイオンは tolaasin I が 6 番目の Ser と 7 番目の Leu7 間のペプチド結合で加水分解された tolaasin I の N 末端側「 β -hydroxyoctanoic acid chain- Δ but1-Pro2-Ser3-Leu4-Val5-Ser6」と tolaasin I の C 末端側「Leu1-Val2-Val3-Gln4-Leu5-Val6- Δ but7-Thr8-Ile9-Hse10-Dab11-Lys12 (Thr8 と Lys12 で環状構造を形成)」と一致した (図 4-3AB)。LC-ESI-MS/MS 解析により得られたプレカーサーイオン m/z 640.39[M+H]⁺由来のプロダクトイオンスペクトルを図 4-3C に m/z 683.43[M+2H]²⁺由来のプロダクトイオンスペクトルを図 4-3D に示した。これらのフラグメントイオンは tolaasin I が 5 番目の Val と 6 番目の Ser 間のペプチド結合で加水分解された tolaasin I の N 末端側「 β -hydroxyoctanoic acid chain- Δ but1-Pro2-Ser3-Leu4-Val5」と tolaasin I の C 末端側「Ser1-Leu2-Val3-Val4-Gln5-Leu6-Val7- Δ but8-Thr9-Ile10-Hse11-Dab12-Lys13 (Thr9 と Lys13 で環状構造を形成)」と一致した (図 4-3CD)。

これらの結果から、Mf103072 株による tolaasin 解毒は tolaasin I のペプチド領域の N 末端側から 5 番目のバリンと 6 番目のセリン、6 番目のセリンと 7 番目のロイシン間においてペプチド結合を加水分解することによっておこることが明らかになった。

環状リポペプチド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 (D'Costa et al., 2012; Hoefler et al., 2012)。さらに、第 2 章で述べた K3-5 株の tolaasin 解毒機構は、菌体外分泌型ではなく、K3-5 株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が、分解箇所については既報と同様に環状構造のエステル結合の加水分解であった。一方で、本章で明らかにした Mf103072 株による tolaasin の加水分解は、ペプチド領域の特定のアミノ酸配列で起こり、これは新規環状リポペプチド類の生分解機構であった。

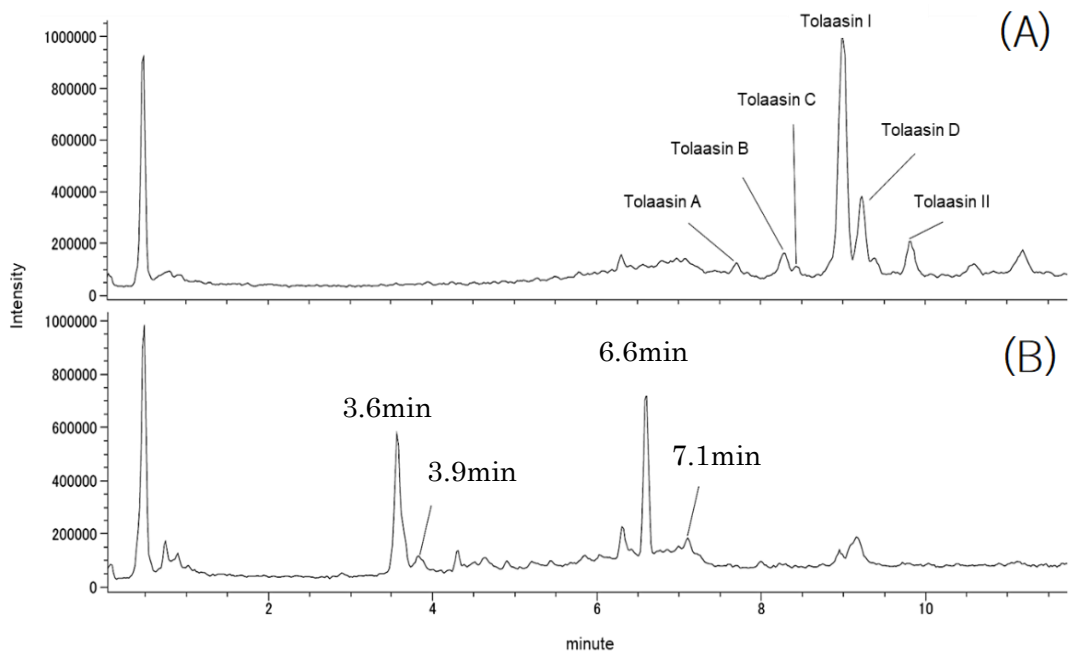


図 4-1 精製 tolaasin および Mf103072 株菌体処理後 tolaasin の TIC クロマトグラム

(A) PBS 処理後精製 tolaasin。Tolaasin ホモログピークのマス (m/z) はそれぞれ A:980、B:987、C:1003、I:994、D:994、II:972。(B) Mf103072 株菌体懸濁液処理後 tolaasin。

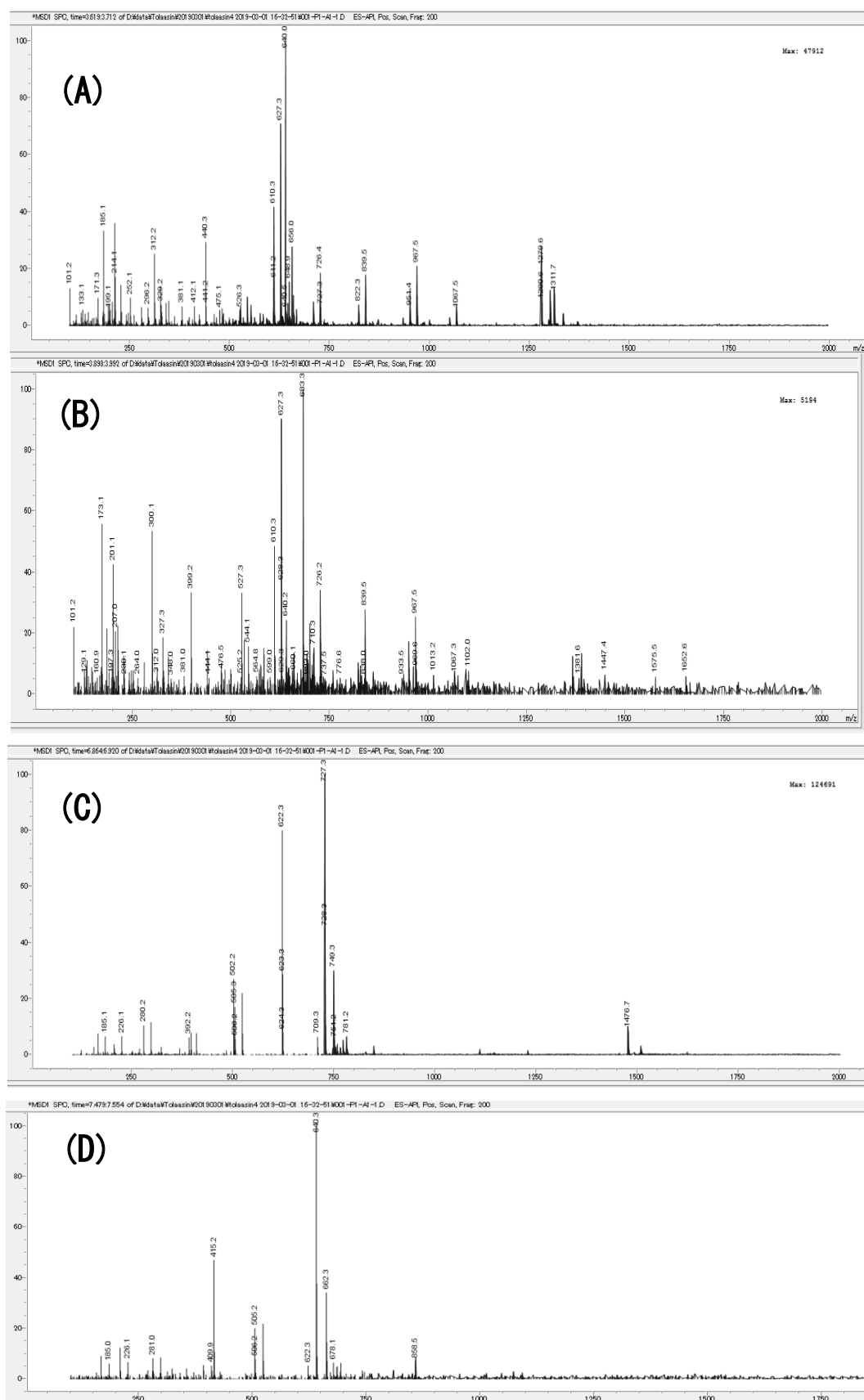
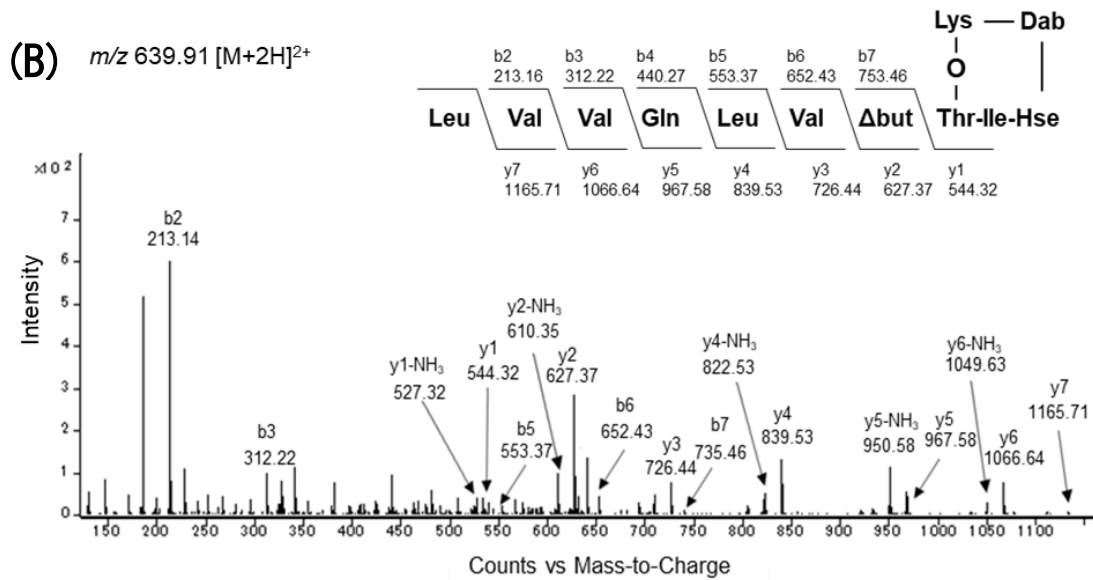
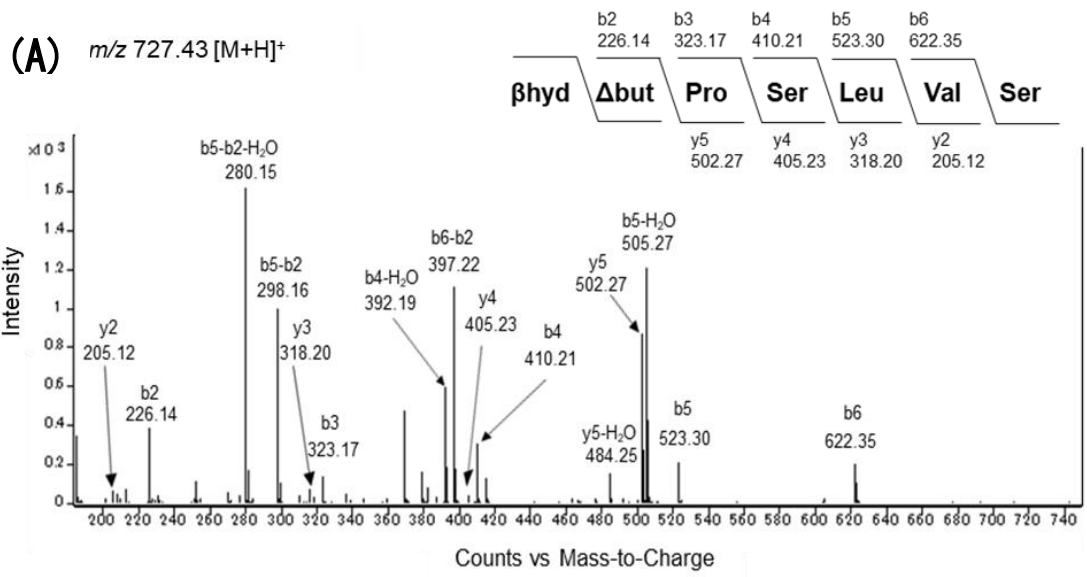


図 4-2 新規物質のマススペクトル

(A)3.6min 付近、(B)3.9min 付近、(C)6.6min 付近、(D)7.1min 付近。



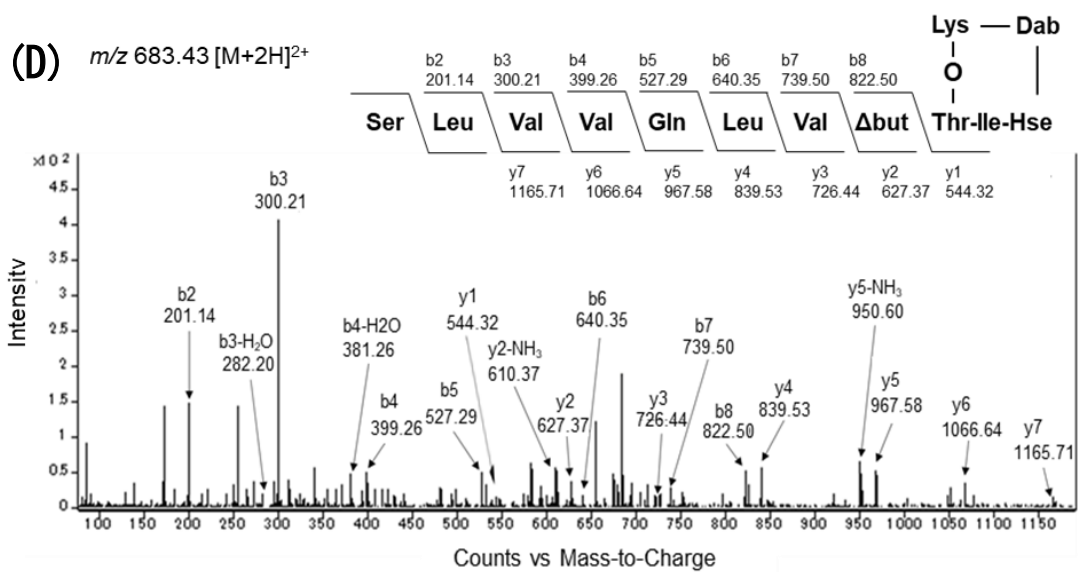
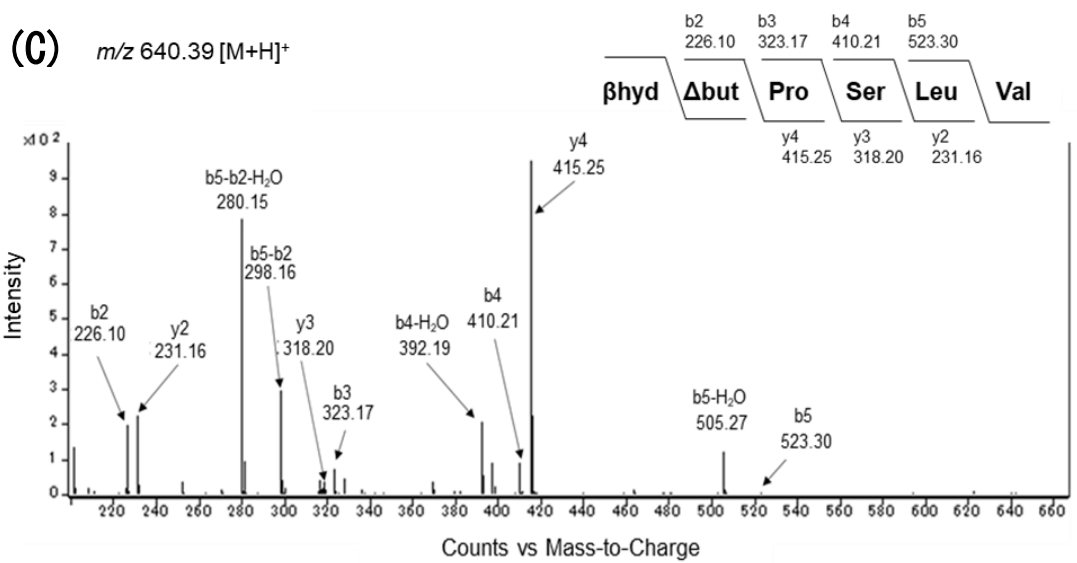


図 4-3 Tolaasin 分解産物のプロダクトイオンスペクトル

(A) m/z 727.43 [M+H]⁺、(B) m/z 639.91 [M+2H]²⁺、(C) m/z 640.39 [M+H]⁺、
 (D) m/z 683.43 [M+2H]²⁺。

2-2 Mf103072 株からの tolaasin 分解酵素抽出

Mf103072 株菌体の TritonX-100 溶液処理後の上清は、tolaasin 分解活性を示した。さらに、Triton X-100 溶液濃度 0~2%のうち、0.05%~0.5%において顕著に高い tolaasin 分解活性が確認された (図 4-4)。このことから、今後の実験において tolaasin 分解酵素を抽出する際には 0.5% Triton X-100 水溶液を用いることとした。0.5% Triton X-100 抽出物による tolaasin 分解後の LC-MS 解析により、tolaasin I が 6 番目のセリンと 7 番目の ロイシン間のペプチド結合および、5 番目のバリリンと 6 番目のセリン間のペプチド結合で加水分解された分解産物である m/z 727 $[M+H]^+$ 、640 $[M+2H]^{2+}$ 、640 $[M+H]^+$ 、683 $[M+2H]^{2+}$ が検出された (図 4-5)。Mf103072 株菌体の 0.5% Triton X-100 抽出物は Mf103072 株菌体と同様の tolaasin 加水分解活性を示したことから、tolaasin 分解因子は、0.5% Triton X-100 処理により、液相へ可溶化することが明らかになった。

さらに、菌体破砕液および酵素抽出液中の 16S rDNA を PCR 法により増幅したところ、酵素抽出液において PCR 産物バンド強度が菌体破砕液と比べて顕著に低かった。この結果から、Mf103072 株のゲノム DNA は Triton X-100 処理を行っても菌体外へほぼ漏出されず、tolaasin 分解因子が菌体表層に局在することが示唆された (図 4-6)。

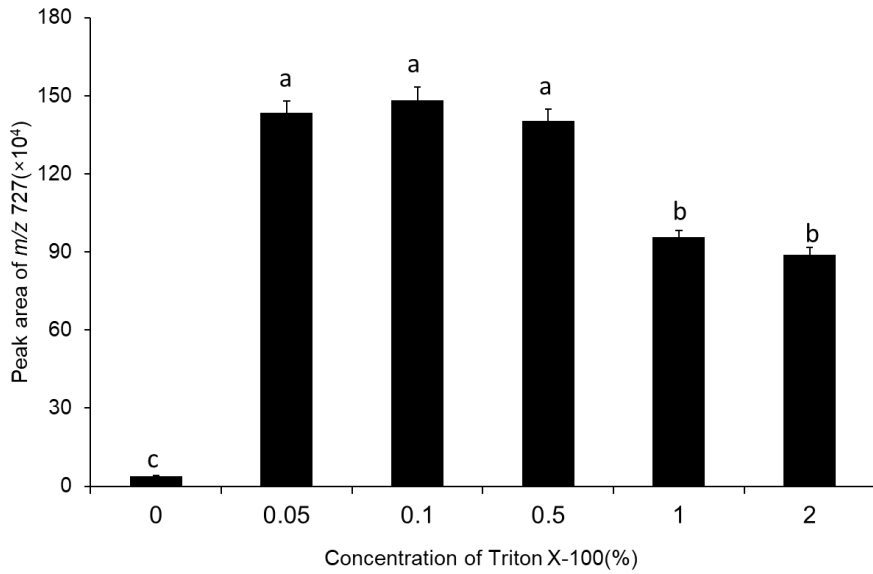


図 4-4 Mf103072 株菌体の 0~2% Triton X-100 処理後上清による tolaasin 分解活性
 平均値+標準誤差 (n=3)。同一アルファベット間に有意差なし(Tukey
 法、 $P<0.05$)。

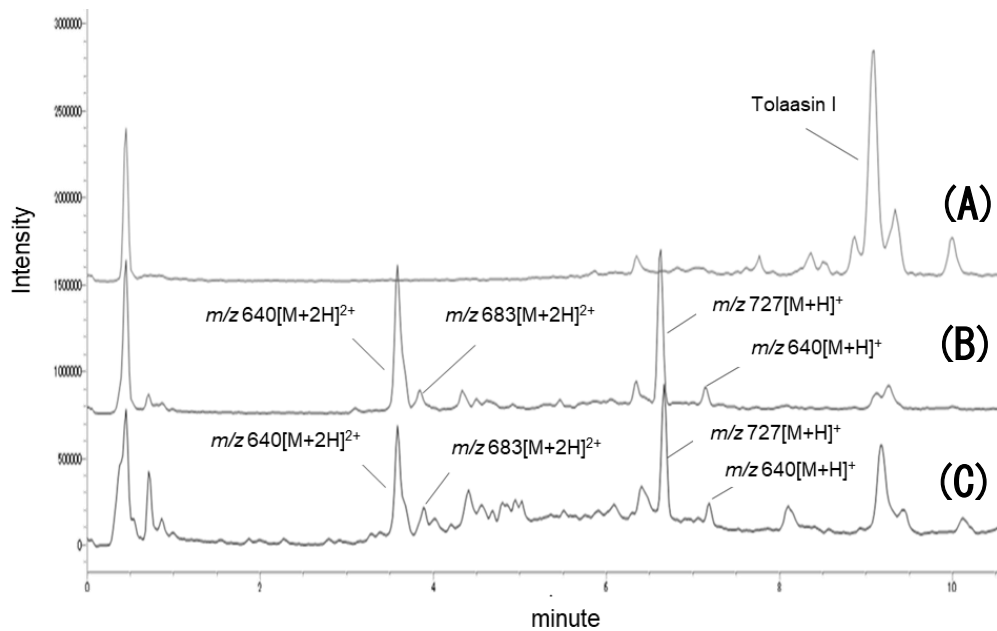


図 4-5 精製 Tolaasin および加水分解後 tolaasin の TIC クロマトグラム
 (A)精製 tolaasin のみ、(B) 菌体懸濁液処理、(C) 酵素抽出液処理。

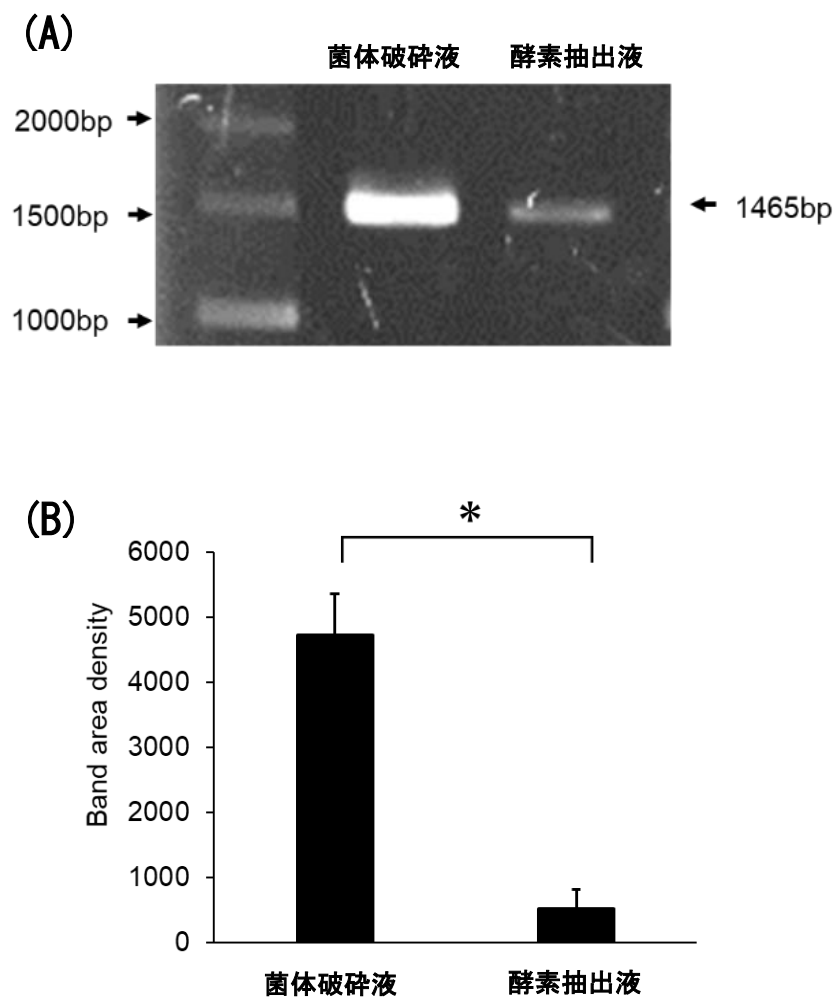


図 4-6 PCR による 16S rRNA 遺伝子の検出

(A) アガロース電気泳動結果、(B)Image J を用いた 16S rDNA の半定量、平均値±標準誤差 (n=3)。*は有意差あり (Student's T-test, $P<0.05$)。

3. 要約

Mf103072 株の tolaasin 解毒機構を解析した。Mf103072 株菌体懸濁液へ tolaasin を処理し、その上清を LC-MS/MS で解析したところ、tolaaasin I 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、Mf103072 株は、前述の K3-5 株とは異なる、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、tolaaasin 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、Mf103072 株の 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。

第 5 章

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

序文

前章において、*Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T (Mf103072) の tolaasin 解毒機構は、tolaaasin 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 cLP 生分解様式によることを明らかにした。本章では、Mf103072 株による生分解について生化学的解析を行うことで、詳細に明らかにすることにした。

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

本学農学科篠原教授により分譲された *Pseudomonas tolaasii* 814 株を tolaasin 精製の際に用いた。また、*Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T を tolaasin 解毒細菌として用いた。すべての供試菌株は使用までグリセロールストックとして -80°C で保存した。

1-2 Tolaasin 精製

Tolaasin の精製は *P. tolaasii* 培養液から、第 3 章 1-2 と同様の方法で行った。

1-3 LC-MS 分析条件

LC-MS 解析は第 4 章と同様の条件で行った。

1-4 菌体懸濁液による tolaasin 除去活性試験

Mf103072 株を King'sB 平板培地 (寒天 1.5%) にストリークし、25°C、48 時間静置培養を行った。その後、シングルコロニーを King'sB 液体培地 2mL に接種し、25°C、24 時間、130rpm で振盪培養を行った。培養後 10000×g、5 分間遠心分離を行い、菌体を Phosphate buffered saline (PBS, 10 mM phosphate-Na bufer pH 6.8, 140 mM NaCl) で洗浄後、PBS で OD_{600nm}=1 に調製し、菌体懸濁液とした。この菌体懸濁液 120μL に 2mg/mL の精製 tolaasin 溶液を 5μL 接種し、25°C、4 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000×g、5 分間遠心分離を行い、上清 120μL を回収し、メタノール 80μL を加え (終濃度 40%) 0.45μm セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP 0.45μm, アドバンテック東洋) に通した後、LC-MS 分析に供した。

1-5 菌体からの tolaasin 加水分解酵素抽出

Mf103072 株を King'sB 平板培地（寒天 1.5%）にストリークし、25°C、48 時間静置培養を行った。出現したシングルコロニーを King's B 液体培地 3mL に接種し、25°C、24 時間、130rpm で振盪培養し前培養液とした。前培養液 2.5mL を King'sB 培地 500mL（1L 容羽根つき三角フラスコ）に接種し、25°C、130rpm、24 時間振盪培養した。培養液 500mL を 4°C、10,000×g、5min で遠心分離後、上清を捨て、得られた菌体を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）により菌体洗浄を行った。菌体洗浄後、10mL の 0.5% に調整した Triton X-100 により再懸濁し、4°C で 2 時間転倒混和した。その後、10,000×g、10min で遠心分離後上清を回収し 0.20μm フィルター（DISMIC-25CS, 0.20μm、アドバンテック東洋）にろ過を行った。

1-6 酵素抽出液による tolaasin 分解活性試験

115μL の酵素抽出液に 5μL の精製 tolaasin 溶液(2mg/mL)を添加し 25°C、4 時間インキュベートした。インキュベート後メタノール 80μL を加え（終濃度 40%）、0.45μm セルロースアセテートフィルター（DISMIC-03CP 0.45μm アドバンテック東洋）に通した後、LC-MS 分析に供した。

1-7 異なる pH 条件における tolaasin 除去および分解活性試験

1-7-1 菌体懸濁液

Mf103072 株菌体を 1-5 と同様の条件で調整後、120μL の 40 mM Britton-Robinson buffer（BR buffer, 40 mM ホウ酸, 40 mM 酢酸, 40 mM リン酸, 1M NaOH）（Britton, H. T. H., 1931）。BR buffer の pH は 4.0~9.0 に調整した。120μL の pH4~9 で懸濁した菌体懸濁液に 5μL の精製 tolaasin 溶液(2mg/mL)を添加し、25°C、1 時間インキュベートした。インキュベート後、10,000×g、5 分間遠心分離を行い、上清 120μL を回収し、メタノール 80μL を加え（終濃度 40%）0.45μm セルロースアセテートフィルター（DISMIC-03CP 0.45μm アドバンテック東洋）に通した後、LC-MS 分析に供した。Tolaasin 除去率は tolaasin I のピーク面積について、BR buffer に精製トラシンを添加し、上記の条件により調製した対照区に対して、各菌株の tolaasin 除去量を百分率で算出した。

1-7-2 酵素抽出液

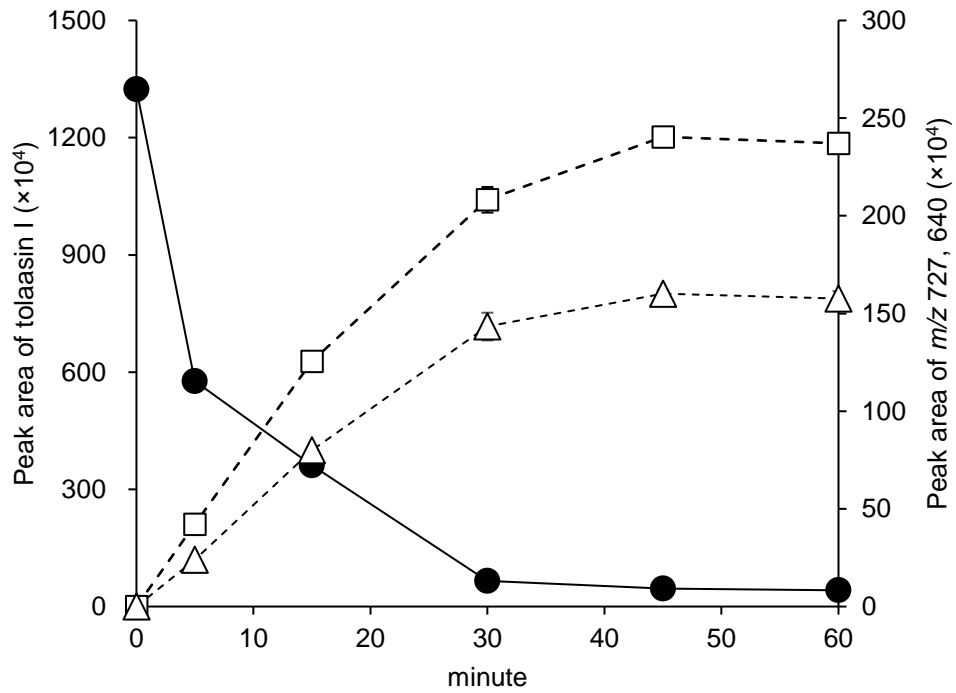
Mf103072 株培養液 1L を 4°C、10,000×g、5min で遠心分離後、上清を捨て、得られた菌体を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) により菌体洗浄を行った。菌体洗浄後、10mL の 0.5% Triton X-100 により再懸濁し、4 °C で 2 時間転倒混和した。その後、10,000×g、10min で遠心分離後上清を回収し 0.20μm フィルター (DISMIC-25CS, 0.20 μm, アドバンテック東洋) にろ過を行った。60μL の酵素抽出液を pH4~9 に調整した 80 mM BR buffer で 2 倍希釈し、120μL の pH4~9 に調整した酵素抽出液を作成した。各 pH に調整した酵素抽出液に 5μL の精製 tolaasin 溶液(2mg/mL)を添加し 25°C、5 時間インキュベートした。LC-MS 分析の為にサンプル調整法および tolaasin 除去率の算出方法は 1-7-1 と同様の方法で行った。

2-1 上清中の tolaasin 除去および分解の経時変化

Mf103072 株菌体懸濁液に tolaasin を添加した際、上清中の tolaasin I は 5 分以内に約 60% が急激に減少し、tolaaasin 添加後 30 分でプラトーに達した。一方で、tolaaasin I、II、A、B、D に由来する N 末端を含む分解産物 m/z 727[M+H]⁺、tolaaasin I、A、D に由来する C 末端を含む分解産物 m/z 640[M+2H]²⁺ は直線的に増加し、tolaaasin 添加後 45 分でプラトーに達した (図 5-1A)。

酵素抽出液に tolaasin を添加した際には、添加した tolaasin I は直線的に減少した。 m/z 727[M+H]⁺ と m/z 640[M+2H]²⁺ においても直線的に増加し、5 時間のインキュベート後もプラトーには達しなかった (図 5-1B)。これらの結果は、Mf103072 株菌体では、tolaaasin の加水分解に先立ち、tolaaasin が菌体へ吸着することを示唆した。さらに、酵素抽出液は tolaaasin I 分解活性が添加後 5 時間までプラトーに達しなかったのに対し、菌体懸濁液では tolaaasin 添加後 45 分で tolaaasin 分解活性はプラトーに達した。このことから、菌体への tolaaasin の吸着は、tolaaasin 分解を効率的なものにしている可能性が示唆された。

(A)



(B)

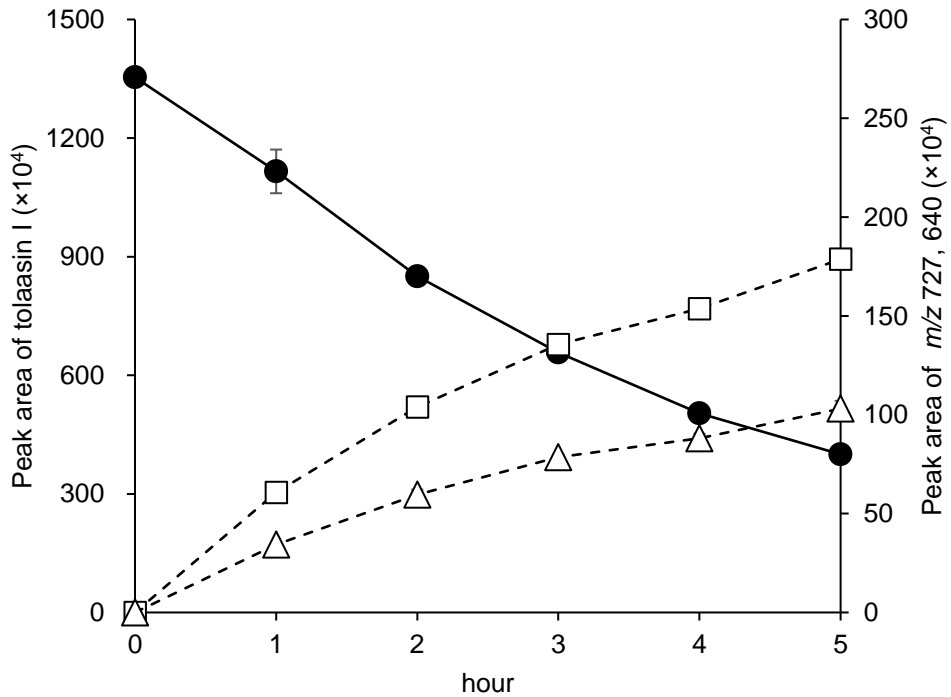


図 5-1 Tolaasin 分解および除去の経時変化

●: Tolaasin I ピーク面積値、□: Tolaasin 分解産物(m/z 727[M+H]⁺)、△: Tolaasin 分解産物(m/z 640[M+2H]²⁺)。 (A) 菌体懸濁液処理、(B) 酵素抽出液処理。平均値±標準誤差 (n=3)。

2-2 異なる pH 条件下での tolaasin 除去および分解活性評価

Mf103072株菌体懸濁液および酵素抽出液における異なる pH 条件下で tolaasin を処理した際の、 tolaasin I 除去率および tolaasin 分解産物量を LC-MS により解析した (図 5-2)。菌体懸濁液処理および酵素抽出液処理どちらにおいても高い pH 条件で急速な tolaasin I の減少が確認された(図 5-2AB)。

Tolaasin 分解産物は、菌体懸濁液と酵素抽出液の両方において、 tolaasin の減少と同様に高 pH 条件下での急速な増加が確認された(図 5-2CD)。

一方で、pH4 条件下での菌体懸濁液処理において 36%の tolaasin I の除去が見られたのに対し(図 5-2A)、分解産物はほとんど検出されなかった(図 5-2C)。この結果は、菌体上に、 tolaasin 分解因子とは別に、 tolaasin 吸着因子が存在することを示唆した。

前項までの結果を踏まえ、Mf103072 株の 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 (図 5-3)。

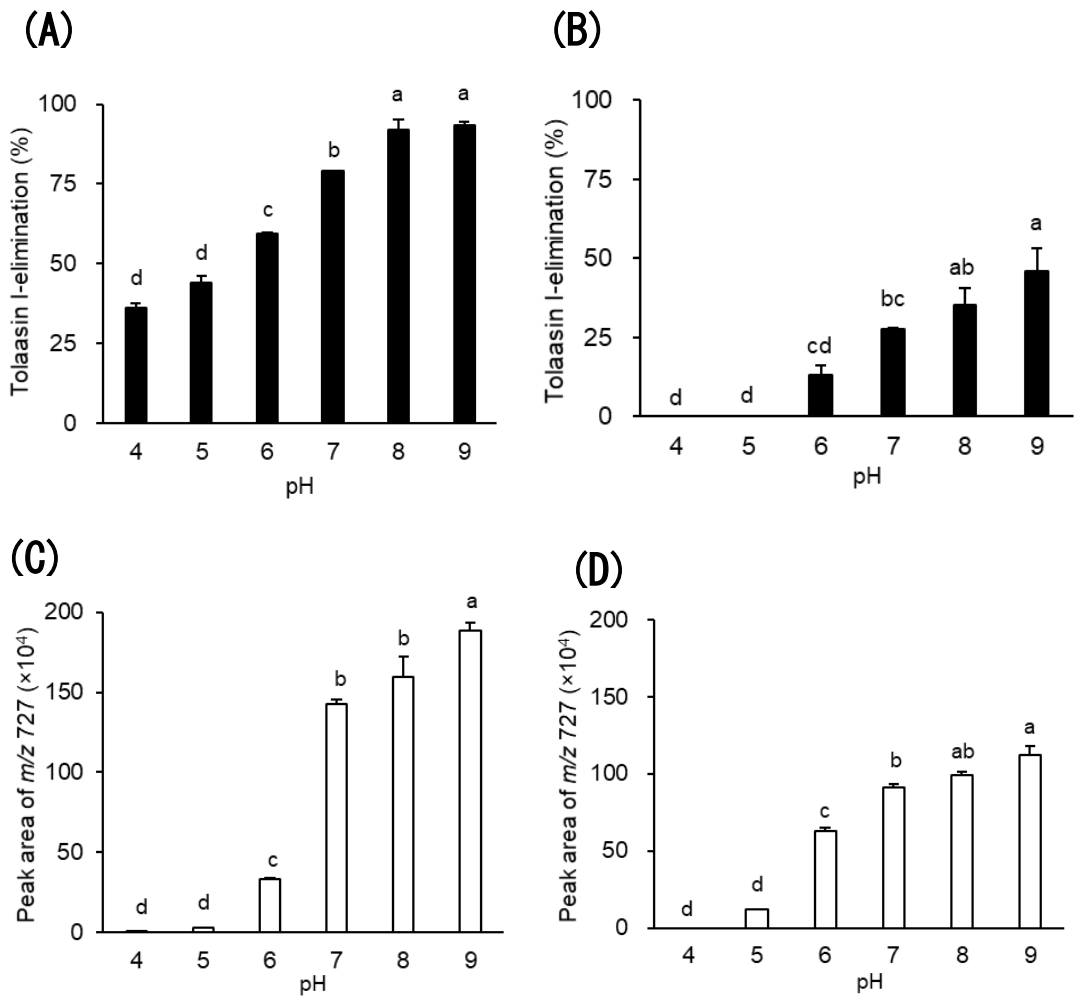


図 5-2 異なる pH 条件下における tolaasin 分解および除去活性

(A) 菌体懸濁液処理による tolaasin I 除去率。(B): 酵素抽出液処理による tolaasin 除去率。(C) 菌体懸濁液処理による tolaasin 分解産物量。(D) 酵素抽出液処理による tolaasin 分解産物量。平均値±標準誤差 (n=3)。同一アルファベット間に有意差なし(Tukey 法, $P<0.05$)。

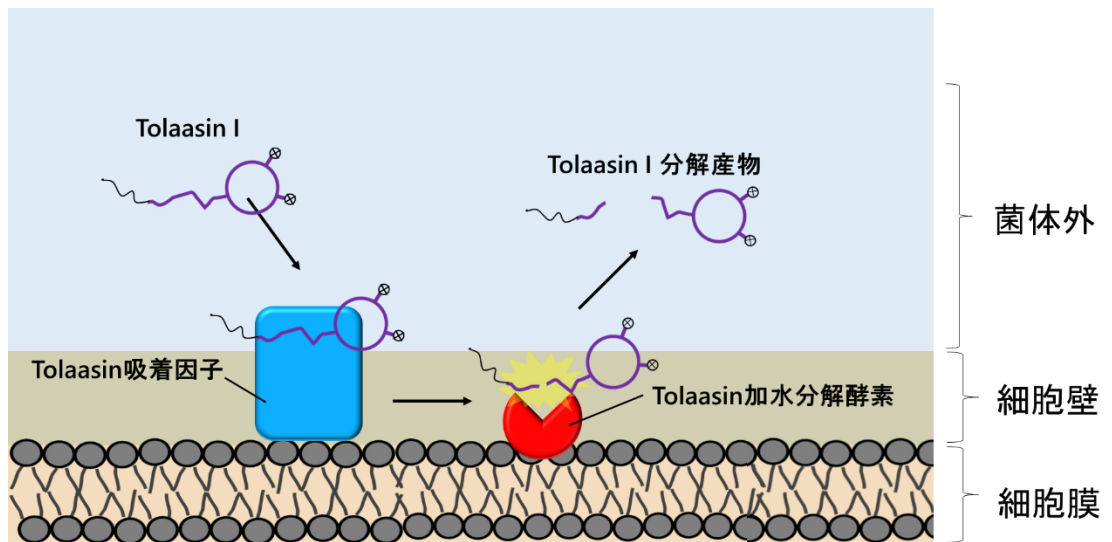


図 5-3 Mf103072 株による tolaasin 解毒機構の仮説

3. 要約

前項で tolaasin 分解活性が認められた Mf103072 株菌体の 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 I 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、両試料の上清中の tolaasin I 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、tolaaasin 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、tolaaasin 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、tolaaasin 除去能は認められた。

これらの結果は、本菌の菌体では、tolaaasin の加水分解に先立ち、tolaaasin 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。

第 6 章

Microbacterium foliorum NBRC 103072^T が保有する tolaasin 加水分解酵素の同定

序文

前章において、*Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T (Mf103072) による tolaasin 解毒は tolaasin の加水分解による抗菌活性の消失であることを明らかにした。細菌類による環状リポデプシペプチドの生分解については、幾つかの報告がある (Hoefler et al., 2012; D'Costa et al., 2012)。しかし、Mf103072 株の tolaasin 生分解機構は、他の生分解菌とは異なる新規の作用機構によるものであった。すなわち、Mf103072 株による tolaasin 生分解は、菌体外分泌酵素ではなく、菌体で起こること、また、環状リポデプシペプチドの加水分解の触媒部位が、環状リポデプシペプチドのペプチド部位の C 末端の環状部位ではなく、ペプチド鎖の内部のペプチド結合であることが挙げられる。従って、Mf103072 株の tolaasin 分解酵素を同定することは、本菌の病害抑制効果を向上させるための基礎的知見となるだけでなく、環状リポデプシペプチドの新規生分解機構として学術的な意義も大きい。

そこで本研究では、Mf103072 株の tolaasin 加水分解酵素を精製し、そのアミノ酸配列情報から分解酵素遺伝子の同定を行うことを目的とした。

1. 材料および実験方法

1-1 供試菌株

本学農学科篠原教授により分譲された *Pseudomonas tolaasii* 814 株を tolaasin 精製の際に用いた。また、*Microbacterium foliorum* NBRC 103072^T を酵素抽出液作成のために用いた。すべての供試菌株は使用までグリセロールストックとして -80°C で保存した。

1-2 Tolaasin 精製

Tolaasin の精製は *P. tolaasii* 培養液から、第 4 章 1-2 と同様の方法で行った。

1-3 LC-MS 分析条件

LC-MS 解析は Infinity II 1260 HPLC (Agilent Technologies) を用い、検出器には Agilent Infinity Lab LC-MSD を使用した。分析カラムは InertSustain C18

column UP (2.0 μ m, 2.1mm \times 100mm, GL Sciences)を使用し、インジェクション量 1 μ L、流速 400 μ L/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ Cの条件で行った。溶離液は 0.1 %v/v ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 %v/v ギ酸アセトニトリル溶液 (B 液) を使用し、A 液として 80%(4 分間)、80% \rightarrow 48% (リニアグラジエント 8 分間) の溶出条件で分析した。

1-4 LC-MS/MS 分析条件

LC-MS/MS 解析は 1260 Infinity series-MS/MS 6563 Accurate-MASS Q-TOF LC/MS(Agilent Technologies)にて分析した。分析カラムは Advance Bio Peptide Map C18 (UP 2.7 μ m, 2.1 \times 150mm, Agilent Technologies)を使用し、流速 400 μ L/min、インジェクション量 5 μ L、カラム温度 40 $^{\circ}$ Cの条件で行った。LC-MS 解析は Infinity II 1260 HPLC (Agilent Technologies) を用い、検出器には Agilent Infinity Lab LC-MSD を使用した。分析カラムは InertSustain C18 column UP (2.0 μ m, 2.1mm \times 100mm, GL Sciences)を使用し、インジェクション量 1 μ L、流速 400 μ L/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ Cの条件で行った。溶離液は 0.1% v/v ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 %v/v ギ酸を含む 90%アセトニトリル溶液 (B 液) を使用し、A 液として 100% \rightarrow 60%(15 分間)、60% \rightarrow 10% (リニアグラジエント 3 分間)、10%(2 分間)の溶出条件で分析した。これらのデータ解析は Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis Software (Version B. 06.00)を用いて行った。

1-5 菌体からの tolaasin 加水分解酵素抽出

Mf103072 株を King'sB 平板培地 (寒天 1.5%) にストリークし、25 $^{\circ}$ C、48 時間静置培養を行った。出現したシングルコロニーを King's B 液体培地 3mL に接種し、25 $^{\circ}$ C、24 時間、180rpm で振盪培養し前培養液とした。前培養液 2.5mL を King'sB 培地 500mL (1L 容羽根つき三角フラスコ) に接種し、25 $^{\circ}$ C、180rpm、24 時間振盪培養した。培養液 500mL を 4 $^{\circ}$ C、10,000 \times g、5min で遠心分離後、上清を捨て、得られた菌体を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) により菌体洗浄を行った。菌体洗浄後、10mL の 0.5%Triton X-100 により再懸濁し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和した。その後、10,000 \times g、10min で遠心分離後上清を回収し 0.20 μ m フィルター (DISMIC-25CS, 0.20 μ m, アドバンテック東洋) にろ過を行ったものを酵素抽出液とした。1mL ずつ分注し、使用するまで-30 $^{\circ}$ Cで冷凍保存した。

1-6 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

得られた酵素抽出液 1mL を陰イオン交換カラム (HiTrap DEAE EF, 1ml, GE ヘルスケアジャパン)に供したのち、その後 0M、0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1.0M NaCl in 0.1% Triton X-100 をそれぞれ 1mL ずつ 3 回カラムに流し、全ての溶出画分を回収した。回収した各画分 115 μ L に 5 μ L の tolaasin (2mg/mL)を加え、25 $^{\circ}$ C、4 時間、インキュベートした。インキュベート後、メタノール 80 μ L を加え (終濃度 40%) 0.45 μ m セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP 0.45 μ m, アドバンテック東洋)に通した後、LC-MS 分析に供した。

また、回収した各画分を SDS-PAGE に供し精製度を確認した。この時、溶出画分をクロロホルムとメタノールを用いて濃縮した。以下にその手順を示す。溶出画分 200 μ L に対し 800 μ L のメタノールを加え、ボルテックスミキサーにより混合した後、200 μ L のクロロホルムを加え、ボルテックスミキサーにより再び混合した。そこへ 600 μ L の s.p.w を加えボルテックスミキサーにより混合後、2,000 \times g、5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、下層に 800 μ L のメタノールを加え、転倒混和した。その後、20,000 \times g、5 分間遠心分離し沈殿を回収し、20 μ L の 8M urea に溶解した。これに 2 \times sample buffer (0.05%(w/v)ブロモフェノールブルー、4%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム、20% glycerol、120mM Tris-HCl pH6.8、10%(v/v) 2-メルカプトエタノール)を 1:1 の混合比になるように添加し、100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱後、SDS-PAGE に供した。アクリルアミド濃度 12.5%(w/v)アクリルアミドゲルを使用し、20mA/枚で電気泳動した。泳動後のゲルは 0.25% CBB-R を含む 50%メタノール-10%酢酸溶液で染色し、50%メタノール-10%酢酸溶液にて脱色した

1-7 疎水性相互作用クロマトグラフィーによる精製

限外ろ過膜 (Amicon Ultra, 0.5mL Centrifugal Filters, 30kDa) に陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製後の溶出画分をアプライし、14,000 \times g、15min \times 3 遠心分離により濃縮画分を回収した。限外ろ過後の濃縮画分 1mL を疎水性相互作用クロマトグラフィー用カラム (HiTrap Phenyl HP, 1ml, GE ヘルスケアジャパン)に供したのち、その後 2 M、1.8M、1.6M、1.4M、1.2M、1M、0M NaCl in 0.1% Triton X-100 をそれぞれ 1mL ずつ 3 回カラムに流し、全ての溶出画分を回収した。回収した各画分 115 μ L に 5 μ L の tolaasin (2mg/mL)を加え、25 $^{\circ}$ C、4 時間、インキュベートした。インキュベート後、メタノール 80 μ L を加え (終濃度 40%) 0.45 μ m セルロースアセテートフィルター (DISMIC-03CP 0.45 μ m, アドバンテック東洋)に通した後、LC-MS 分析に供した。また、1-6 と同様に、回

収した各画分を SDS-PAGE に供し精製度を確認した。各画分は 1-6 と同様の方法で濃縮した。

1-8 Blue Native PAGE

1-6、1-7 にて得られた活性画分を限外ろ過膜 (Amicon Ultra 0.5mL Centrifugal Filters 30kDa) にアプライし、14,000×g、15 分間×3 遠心分離により濃縮画分を回収した。限外ろ過後の濃縮画分 20μL に 3×sample buffer (BisTris 0.418g, 6 N HCl 0.107ml, glycerol 4g, NaCl 0.117g, CBB G-250 0.15mg, SPW 10mL) を 10μL 加え、泳動用試料とした。1×NativePAGE running buffer(Invitrogen)を泳動槽下部(WSE-1010/25 CompactPAGE Ace, アトー)の線まで注ぐ。これを 4-16%(w/v) アクリルアミドゲル (NativePAGE 4-16% Bis-Tris Gel, Invitrogen)を泳動槽にセットし、泳動槽上部に Cathode Running buffer (0.4% CBB G-250 in 1×NativePAGE running buffer)を注ぐ。マーカー (NativeMark Unstained Protein Standard, Invitrogen) 2μL と調整したサンプル 10μL をウェルにアプライし、10mA、電圧 150V にて 90 分間、低温室 (4°C) にて電気泳動を行った。

1-9 ゲル内 tolaasin 分解活性評価

1-8 で得られた電気泳動後の分離ゲルを 20 等分に切り出しそれぞれに 0.5mg/mL tolaasin in 0.1% Triton X-100 を 50μL 添加し、25°C で一晩インキュベートした。一晩インキュベート後の tolaasin 溶液の上清 40μL を回収し、そこへ 100%メタノール 40μL を添加し、4°C、15000×g、5 分間遠心分離後の上清を回収し、LC-MS 分析に供した。

1-10 トリプシンによるゲル内消化処理

1-9 で tolaasin 分解活性が確認されたゲル片にチューブあたり 100μL の脱色液 (50%アセトニトリル, 25mM 重炭酸アンモニウム) を加え、室温 (25°C) で 10 分間振盪し、脱色液をピペットで取り除いた。ゲル片から CBB 染色液が完全に抜けるまでこの作業を繰り返した。ゲル片にチューブあたり 100μL のアセトニトリルを加え、室温で 5 分間振盪後、アセトニトリルを取り除いた。減圧濃縮遠心エバポレーターを用いて真空にし、ゲルを乾燥させた。チューブあたり 100μL の還元液 (10mM ジチオスレイトール, 25mM 重炭酸アンモニウム) を加え、56°C で 1 時間振盪した。1 時間後、室温に戻し、還元液をピペットで取り除いた。チューブあたり 100μL のアルキル化液 (55mM ヨードアセトアミド, 25mM 重炭酸アンモニウム) を加え、アルミホイルで遮光し、室温で 45 分間振盪した。液を取り除き、チューブあたり 100μL の洗浄用バッファー (25mM 重炭酸アンモニ

ウム)を加え、室温で10分間振盪した。チューブあたり200 μ Lの脱水液(50%アセトニトリル, 25mM重炭酸アンモニウム)を加え、室温で10分間振盪した。脱水液をピペットで取り除き、1~2をもう一度繰り返し、ゲルを脱水した。減圧濃縮遠心エバポレーターを用いて真空にし、ゲルを乾燥させた。チューブあたり30 μ Lのトリプシン溶液(10 μ g/mL Trypsin Promega, 50mM重炭酸アンモニウム)を加え、30分間氷上で放置し、乾燥したゲルにトリプシン溶液を染み込ませた。余分なトリプシン溶液をピペットで取り除き、37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。チューブあたり50 μ Lの抽出液(50%アセトニトリル, 5%トリフルオロ酢酸)を加え、室温で30分振盪後、抽出液をピペットで回収した。この作業を3回繰り返し、3回分回収した抽出液を合わせて、減圧濃縮遠心エバポレーターで30~50 μ Lになるまで濃縮し、10000 \times g、3min遠心分離後、上清をLC-MS/MS分析に供した。

1-11 MASCOT サーチによるタンパク質の探索

得られた解析データから、MASCOT サーチによりタンパク質を探索した。探索方法としては、MS/MSの質量スペクトル(プリカーサイオン質量とプロダクトイオン質量・強度のセット)にマッチするペプチドを配列データベースから検索する方法である、MIS検索を使用した。

2. 結果および考察

2-1 陰イオン交換クロマトグラフィーによる tolaasin 加水分解酵素精製

Tolaasin 加水分解酵素が 0.1% Triton X-100 存在下で陰イオン交換樹脂に結合し、0.4M-0.5M の NaCl in 0.1% Triton X-100 で溶出することが可能であることが示された(図 6-1)。精製確認のため SDS-PAGE を行った結果、多くの夾雑タンパク質が除去されたものの、未だ複数のバンドが検出され、目的酵素の単離には至らなかった(図 6-2)。

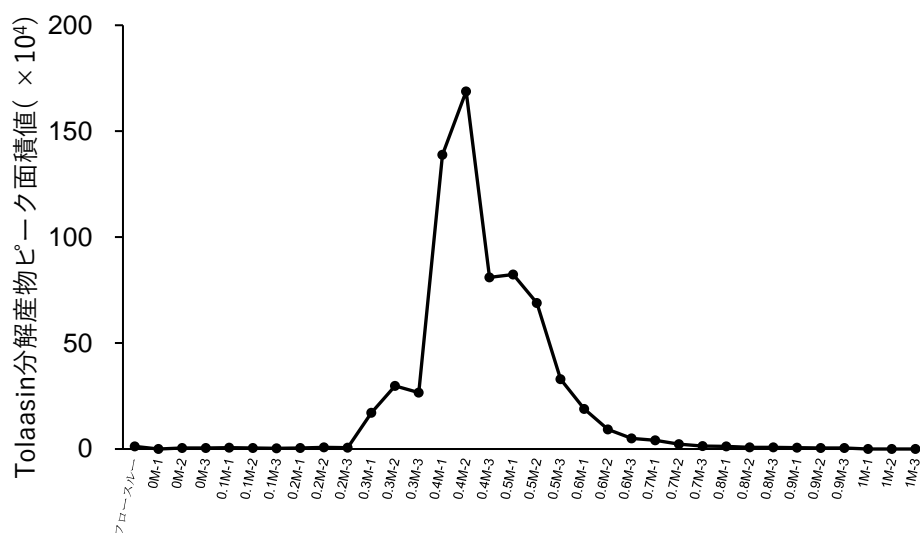


図 6-1 陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた画分の tolaasin 分解活性

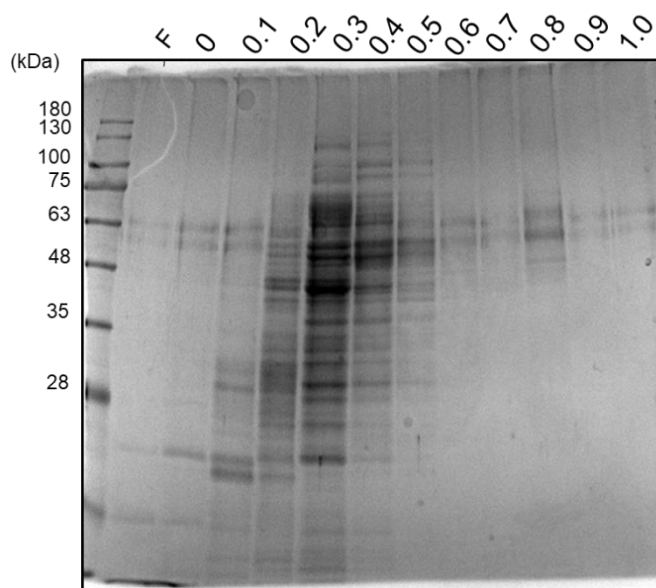


図 6-2 SDS-PAGE による各溶出画分のタンパク質バンドの確認

F:フロースルー、0-1.0: NaCl 濃度(M)。

2-2 疎水性相互作用クロマトグラフィーによる tolaasin 加水分解酵素精製

2-1 で陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行い活性が確認された 0.4M と 0.5M での溶出画分を、限外ろ過により濃縮し疎水性相互作用クロマトグラフィーにより tolaasin 加水分解酵素の単離を試みた。Tolaasin 加水分解酵素が 0.1% Triton X-100 存在下で HiTrap Phenyl HP カラムに結合し、1.2M-0.8M の NaCl in 0.1% Triton X-100 で溶出することが可能であることが示された(図 6-3)。しかし、精製確認のため SDS-PAGE を行った結果、多くの夾雑タンパク質が除去されたものの、未だ複数のバンドが検出され、目的酵素の単離には至らなかった(図 6-4)。

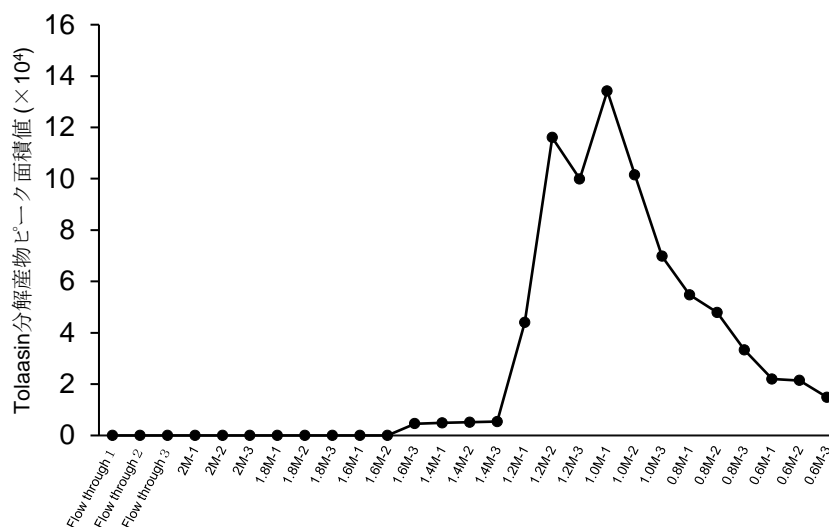


図 6-3 疎水性相互作用クロマトグラフィーにより得られた画分の tolaasin 分解活性。

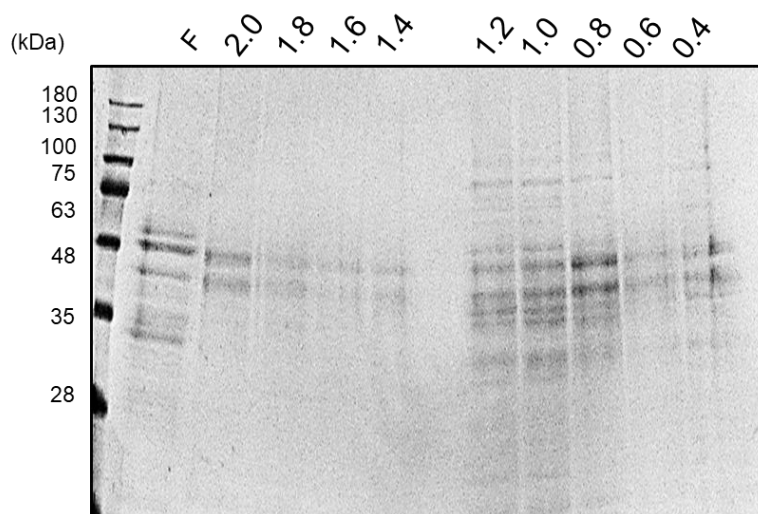


図 6-4 SDS-PAGE による各溶出画分のタンパク質バンドの確認
F: フロースルー、2.0-0.4: NaCl 濃度(M)。

2-3 Blue Native PAGE を用いたゲル内酵素活性評価

Mf103072 株菌体の界面活性剤水溶液処理により得た酵素抽出液を用いて、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が、SDS-PAGE において未だ複数のバンドが検出されたため、Blue Native-PAGE へ供した。泳動後のゲルを切り出し、tolaasin 溶液へ入れ、1 晩反応後の上清中の tolaasin 分解物を LC-MS で検出したところ、140~240kDa 付近から切り出したゲルに tolaasin 分解活性が確認された(図 6-5B)。この結果から、Blue Native PAGE による分離後の tolaasin 加水分解酵素はゲル内においても活性を保持しており、溶液中の tolaasin を加水分解することが可能であることが示された。さらに、Blue Native PAGE 後のゲルを CBB 染色したところ、66kDa 付近からは複数バンドが検出された一方で、tolaasin 分解活性は確認されなかったことから、Blue Native PAGE により夾雑タンパク質と tolaasin 加水分解酵素を分離することが出来たといえる(図 6-5A)。

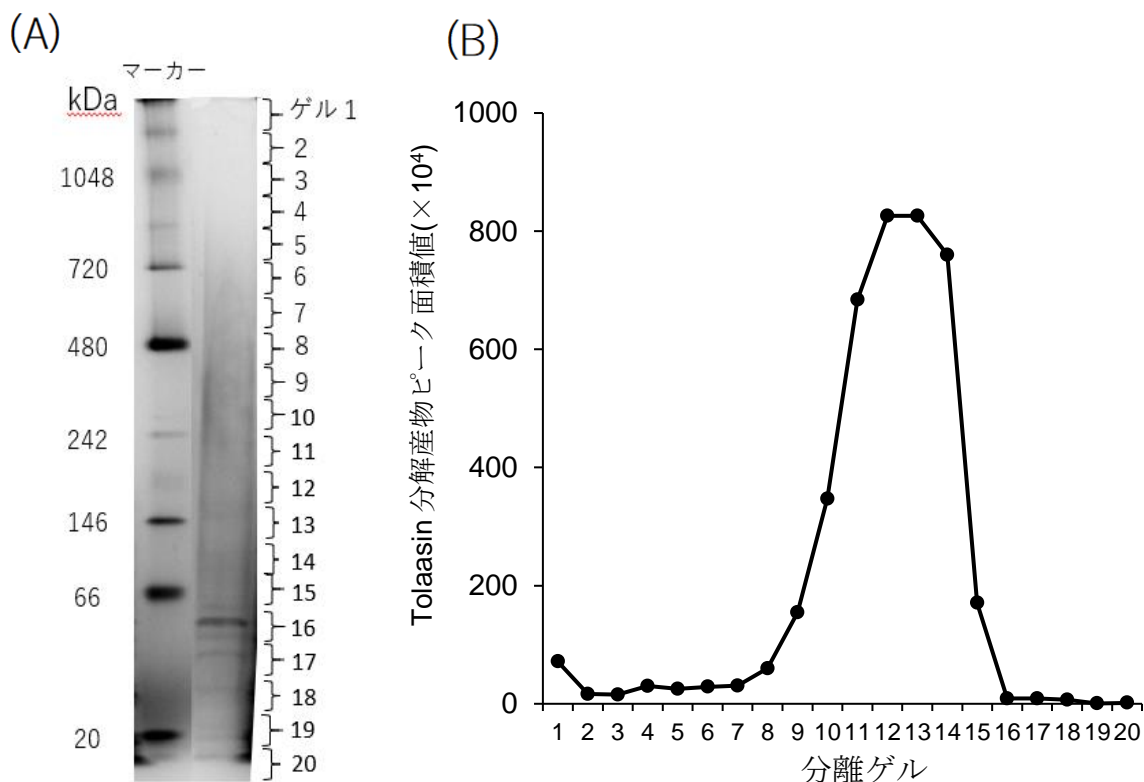


図 6-5 Blue Native PAGE を用いたゲル内酵素活性評価

(A) Blue Native-PAGE 後のゲルの泳動写真、(B) Blue Native-PAGE により得られたゲルの tolaasin 分解活性。

2-4 MASCOT サーチによるタンパク質の探索

2-3 において、140~240kDa 付近から切り出したゲルに tolaasin 分解活性が確認された。この活性が認められゲルを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。得られた解析データから、タンパク質を探索 (MASCOT サーチ) したところ、10 種のタンパク質が特定された。特定されたタンパク質には、糖代謝関連が 2 種、膜輸送体関連が 2 種、アミノ酸代謝関連が 1 種、脂質代謝関連が 1 種、転写制御因子が 1 種、リボソームのサブユニットが 1 種、未同定のものが 1 種に加えて、プロテアーゼとして Aminopeptidase N が 1 種含まれた (表 6-1)。前章で明らかにした通り、Mf103072 株による tolaasin の分解様式は、ペプチド結合の加水分解反応であったため、tolaasin 加水分解酵素は、Aminopeptidase N であると推定された。

表 6-1 ゲル内トリプシン消化により同定されたタンパク質

Family	Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of significant matches	Num. of sequences	Identified proteins
1	WP_045253391.1	375	43037	53	25	10	amino acid ABC transporter substrate-binding protein [<i>Microbacterium foliorum</i>]
2	WP_045253526.1	210	37987	19	15	2	BMP family ABC transporter substrate-binding protein [<i>Microbacterium foliorum</i>]
3	WP_021200455.1	88	54915	32	6	12	MULTISPECIES: glycerol kinase [<i>Microbacterium</i>]
4	WP_030965491.1	64	11496	3	1	1	30S ribosomal protein S14 [<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-378]
5	WP_045254229.1	51	48422	20	2	6	succinate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Microbacterium foliorum</i>]
6	WP_045254251.1	51	47061	16	6	4	sugar ABC transporter substrate-binding protein [<i>Microbacterium foliorum</i>]
7	WP_045255180.1	39	93626	9	2	5	aminopeptidase N [<i>Microbacterium foliorum</i>]
8	WP_029144597.1	34	130518	1	1	1	transcription-repair coupling factor [<i>Microbacterium luticocti</i>]
9	WP_083896202.1	26	20213	1	1	1	hypothetical protein [<i>Nocardia jiangxiensis</i>]
10	WP_056609068.1	21	41888	1	1	1	ROK family transcriptional regulator [<i>Aeromicrobium</i> sp. Root472D3]

3. 要約

Mf103072 株の tolaasin 分解酵素の同定を目的として、to laasin 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、Mf103072 株の 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、to laasin 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。

第7章

総括

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、へこみ等を生じることから、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、本病細菌の産生する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、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が世界各国で探索されてきた。本病害の生物防除を目的とした研究事例は、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であり、実用化までには至っていない。

共同研究者の篠原らは、本病害に対する新たな生物防除戦略として、toalaasin 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。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、toalaasin 解毒機構を解析した。

はじめに、シイタケ子実体から分離された tolaasin 解毒菌株である *Microbacterium* sp. K3-5（以下、K3-5）の tolaasin 解毒機構を解析した。K3-5 培養液へ tolaasin を添加すると、上清中の tolaasin を高効率に除去した。そこで、本菌の tolaasin 除去機構を明らかにするため、K3-5 株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 株の 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。さらに、菌体懸濁液処理後の上清を LC-MSMS により分析したところ、toalaasin 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 株菌体処理による tolaasin 解毒能をジャガイモ塊茎切片の褐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、K3-5 の tolaasin の解毒は、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によって引き起こされることを特定した。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 株の 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、菌体外への分泌型酵素によるものではなく、K3-5 菌体のみ活性が認められる新規の cLP 生分解様式であった。

次に、K3-5 株による高い tolaasin 解毒能は *Microbacterium* 属に共通した特徴であるのか、またその解毒機構は同様であるのかについて明らかにするために *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 株と同様に、いず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、いずれの菌株も培養菌体の上清中の tolaasin 除去能が認められた。しかし、tolaasin 処理した菌体を、きのこ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。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。

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。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。このことから、*M. foliorum* NBRC 103072 は tolaasin 分解能を有することが示唆された。しかし、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。

前述において、唯一菌体上で tolaasin の毒素活性を示さなかった *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 株とは

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。

さらに 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、上清中の tolaasin 除去と分解産物の生成はどちらも pH4 及び 5 で最も低く、pH9 で最も高い値を示した。一方、菌体懸濁液では上清中の tolaasin 除去と分解産物の生成は抽出液と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。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 のペプチド鎖内部の特異的なペプチド結合を加水分解可能な分解酵素によって成し遂げられることが示唆された。

最後に、*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、*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 分解酵素を同定するとともに、その性状を明らかにする必要がある。

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。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、① tolaasin 加水分解酵素は分泌されず、菌体中存在すること、② 菌株によって触媒部位が異なり、中でも③ cLP 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、toलाasin 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、toलाasin 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である本属の tolaasin 解毒には tolaasin 加水分解活性が鍵となるという知見から、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処理条件の最適化を図ることが可能となる。将来、本研究の成果が、生物防除剤を利用した安定的なきのこ栽培法の確立に寄与し、きのこ産業の発展に貢献することが期待される。

Summary

Brown blotch is the most important diseases in the mushroom cultivation industry and discourages farmers with significant economic losses in several countries including Japan. The causal agent, *Pseudomonas tolaasii*, causes unappealing brown or cream lesions on pileus and stipe of fruiting bodies across a broad range of mushrooms.

Tolaasins were identified as the toxin compounds produced by *P. tolaasii* to elicit the disease symptoms. Tolaasins I and II have been identified as major toxin lipodepsipeptides consisting of an octadecyl peptide with β -hydroxyoctanoic acid. In addition, tolaasins A, B, C, D, and E have been identified as minor analogues.

In Japan, although benomyl is registered as a chemical fungicide to use for mushroom production, there are no chemical pesticides to control bacterial diseases of cultivated mushrooms. Therefore, biological pesticides against bacterial diseases are desired.

To develop biological pesticides against brown blotch disease of cultivated mushrooms, researchers have searched for microbes with bactericidal activity against *P. tolaasii*. Sahin (2005) isolated *Streptomyces* spp., which secrete antimicrobial compounds, as antagonistic microbes to reduce the population of *P. tolaasii*. Bacteriophages were also reported as an alternative biological method to control the disease with their bactericidal activities against *P. tolaasii*.

We previously isolated 12 tolaasin-detoxifying bacteria, including *Microbacterium* sp. K3-5 (K3-5), from 542 bacterial isolates obtained from healthy fruiting bodies of *Lentinula edodes*. Although several kinds of bacterial isolates have been reported as tolaasins-detoxifying bacteria, the process of detoxification of tolaasins remains unclear. Therefore, in this study, we aimed to clarify the tolaasins-detoxifying properties of K3-5 and *Microbacterium* spp.

Firstly, we evaluated the tolaasins-detoxifying properties of K3-5. K3-5 shows significantly higher tolaasin I-eliminating activity in liquid culture than a *Bacillus* strain. Notably, the activity was observed by treatment with cell suspensions but not with culture supernatants. K3-5 cells detoxify tolaasin by hydrolysis at the lactone ring between the hydroxyl group of the D-Thr14 and the C-terminal L-Lys18. The hydrolyzed tolaasin is released from K3-5 cells into a supernatant, and the hydrolyzed tolaasin was inactivated on its antifungal activity. Our data suggest

that the cyclic structure in the peptide moiety of tolaasin is critical for bacterial cell adhesion to express the antimicrobial activity.

The tolaasin-detoxifying activities of various type strains of *Microbacterium* spp. were evaluated through chemical and biological assays. The bacterial cells of all tested strains of *Microbacterium* spp. showed tolaasin I elimination from liquid phase. However, the toxin activities of tolaasins were still retained on the tolaasin-treated bacterial cells of all *Microbacterium* strains except *M. foliorum* NBRC 103072^T. Furthermore, intact tolaasin I was recovered from the tolaasin-treated bacterial cells of all tested strains except *M. foliorum* NBRC 103072^T. Our data reveals that *Microbacterium* spp. can be characterized as effective tolaasin I-eliminating bacteria through cell adsorption, but that this adsorption alone is insufficient for actual tolaasin detoxification. The biological degradation process must be needed to carry out the detoxification.

Among the tested strains described above, *M. foliorum* NBRC 103072^T showed highest tolaasin-detoxification activity. Hence, we characterized the tolaasin-detoxification process of *M. foliorum* NBRC 103072^T. The tolaasin-detoxification by *M. foliorum* NBRC 103072^T was carried out by hydrolyzation of tolaasins at two specific sites in the peptide moiety of tolaasins by its cells, and the resulting fragments were released from bacterial cells. The tolaasin-hydrolyzing activity can be extracted by neutral detergent solution from *M. foliorum* NBRC 103072^T cells. Moreover, tolaasin-adsorption to the bacterial cells occurred prior to hydrolyzation of tolaasins, which might contribute to the effective tolaasin-detoxification by *M. foliorum* NBRC 103072^T. It is notable that the tolaasin-degradation process by *M. foliorum* NBRC 103072^T is carried out by hydrolyzation at specific sites in the peptide moiety of lipopeptide by bacterial cells as a novel biological degradation process of cyclic lipopeptides.

In order to identify the tolaasin-hydrolyzing enzyme, an in-gel enzyme assay with Blue Native-PAGE was developed. The protein band which showed tolaasin-hydrolyzing activity was digested by trypsin and identified by tandem LC/MS/MS to perform peptide mapping. When many of the proteins identified were annotated as several functions, Aminopeptidase N was predicted to have hydrolytic activity on the peptide moiety in tolaasin I. In the future, the construction of deletion mutant of Aminopeptidase N will be needed to identify the tolaasin-hydrolyzing enzyme of *M. foliorum* NBRC 103072^T.

In biological control of plant diseases with useful microorganisms, elucidation of the mechanisms will be the basis for planning more effective biological control methods. In the future, the results of this research are expected to contribute to the establishment of stable mushroom cultivation methods by using biological control agents and to the development of the mushroom industry.

第8章

参考文献

- 白田 昭, 菅谷和寿, 高杉光雄, 門出健次 (1995). 栽培ヒラタケに腐敗病を起こす日本産 *Pseudomonas tolaasii* の産生する毒素とその生物活性. *日本植物病理学会報*, 61, 493-502
- 横田健治, 七海隆之, 富田駿, キム オッキョン, 根岸寛光, 篠原弘亮 (2018). 栽培シイタケの細菌叢解析とトラシン解毒細菌の分離および *Pseudoxanthomonas* 属細菌のトラシン解毒機作. *日本きのこ学会誌*, 25 (4), 129–133.
- Bassarollo, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Lo Cantore, P., Iacobellis, N. S., Riccio, R., Gomez-Paloma, L., & Evidente, A. (2004). Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Journal of Natural Products*, 67(5), 811–816. <https://doi.org/10.1021/np0303557>
- Behrendt, U., Ulrich, A., & Schumann, P. (2001). Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4). <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1267>
- Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., & Fox, P. F. (2001). *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6). <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-1969>
- Britton, H. T. H., and R. R. A. (1931). Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, 1456–1462.
- Brodey, C. L. (1991). Bacterial Blotch Disease of the Cultivated Mushroom Is Caused by an Ion Channel Forming Lipodepsipeptide Toxin. In *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 4, Issue 4, p. 407). <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-407>
- D'Costa, V. M., Mukhtar, T. A., Patel, T., Koteva, K., Waglechner, N., Hughes, D. W., Wright, G. D., & De Pascale, G. (2012). Inactivation of the lipopeptide antibiotic daptomycin by hydrolytic mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 757–764. <https://doi.org/10.1128/AAC.05441-11>
- Han, H. S., Jhune, C. S., Cheong, J. C., Oh, J. A., Kong, W. S., Cha, J. S., & Lee, C. J. (2012). Occurrence of black rot of cultivated mushrooms (*Flammulina velutipes*) caused by *Pseudomonas tolaasii* in Korea. *European Journal of Plant Pathology*, 133(3), 527–535. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-9941-4>

- Hoefler, B. C., Gorzelnik, K. V., Yang, J. Y., Hendricks, N., Dorrestein, P. C., & Straight, P. D. (2012). Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(32), 13082–13087. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205586109>
- Imai, K., Takeuchi, M., & Banno, I. (1984). Reclassification of “*Flavobacterium arborescens*” (Frankland and Frankland) Bergey et al. in the genus *Microbacterium* (Orla-Jensen) Collins et al., as *Microbacterium arborescens* comb. nov., nom. rev. *Current Microbiology*, *11*(5). <https://doi.org/10.1007/BF01567386>
- Jo, G., Hwang, D., Lee, S., Woo, Y., Hyun, J., Yong, Y., Kang, K., Kim, D. woon, & Lim, Y. (2011). In silico study of the ion channel formed by tolaasin i produced by *pseudomonas tolaasii*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(10), 1097–1100. <https://doi.org/10.4014/jmb.1103.03026>
- Kageyama, A., Matsuo, Y., Kasai, H., Shizuri, Y., Omura, S., & Takahashi, Y. (2008). *Microbacterium awajiense* sp. nov., *Microbacterium fluvii* sp. nov. and *Microbacterium pygmaeum* sp. nov. *Actinomycetologica*, *22*(1). <https://doi.org/10.3209/saj.saj220101>
- Kageyama, A., Takahashi, Y., Matsuo, Y., Adachi, K., Kasai, H., Shizuri, Y., & Omura, S. (2007). *Microbacterium flavum* sp. nov. and *Microbacterium lacus* sp. nov., isolated from marine environments. *Actinomycetologica*, *21*(2). <https://doi.org/10.3209/saj.saj210201>
- Kageyama, A., Takahashi, Y., Matsuo, Y., Kasai, H., Shizuri, Y., & Omura, S. (2007). *Microbacterium sediminicola* sp. nov. and *Microbacterium marinilacus* sp. nov., isolated from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(10). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65038-0>
- Kageyama, A., Takahashi, Y., & Omura, S. (2006). *Microbacterium deminutum* sp. nov., *Microbacterium pumilum* sp. nov. and *Microbacterium aoyamense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(9). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64236-0>
- Laffineur, K., Avesani, V., Cornu, G., Charlier, J., Janssens, M., Wauters, G., & Delmée, M. (2003). Bacteremia due to a novel *Microbacterium* species in a patient with leukemia and description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2242-2246.2003>
- Matsuyama, H., Kawasaki, K., Yumoto, I., & Shida, O. (1999). *Microbacterium kitamiense* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from the wastewater of a sugar-beet factory. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*(4). <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1353>
- Nguyen, H. T. D., Yoon, S., Kim, M. H., Kim, Y. K., Yoon, M. Y., Cho, Y. H., Lim, Y., Shin, S. H., & Kim, D. E. (2012). Characterization of bacteriophage φPto-bp6g, a

- novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms. *Journal of Microbiological Methods*, 91(3), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.032>
- Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Williams, D. H., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., & Johnstone, K. (1991). Structure Determination of Tolaasin, an Extracellular Lipodepsipeptide Produced by the Mushroom Pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Journal of the American Chemical Society*, 113(7), 2621–2627. <https://doi.org/10.1021/ja00007a040>
- Osdaghi, E., Martins, S. J., Ramos-Sepulveda, L., Vieira, F. R., Pecchia, J. A., Beyer, D. M., Bell, T. H., Yang, Y., Hockett, K. L., & Bull, C. T. (2019). 100 years since Tolaas: Bacterial blotch of mushrooms in the 21st century. *Plant Disease*, 103(11), 2714–2732. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0589-FE>
- Pent, M., Pöldmaa, K., & Bahram, M. (2017). Bacterial communities in boreal forest mushrooms are shaped both by soil parameters and host identity. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00836>
- Sahin, N. (2005). Antimicrobial activity of Streptomyces species against mushroom blotch disease pathogen. *Journal of Basic Microbiology*, 45(1), 64–71. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410427>
- Sajben-Nagy, E., Maróti, G., Kredics, L., Horváth, B., Párducz, Á., Vágvölgyi, C., & Manczinger, L. (2012). Isolation of new *Pseudomonas tolaasii* bacteriophages and genomic investigation of the lytic phage BF7. *FEMS Microbiology Letters*, 332(2), 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02592.x>
- Schippers, A., Bosecker, K., Spröer, C., & Schumann, P. (2005). *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63305-0>
- Schleifer, K. H., Hayn, I., Seidl, H. P., & Firl, J. (1983). Threo- β -hydroxyornithine: A natural constituent of the peptidoglycan of *Corynebacterium* species Co 112. *Archives of Microbiology*, 134(3). <https://doi.org/10.1007/BF00407766>
- Schumann, P., Rainey, F. A., Burghardt, J., Stackebrandt, E., & Weiss, N. (1999). Reclassification of *Brevibacterium oxydans* (chatelain and second 1966) as *Microbacterium oxydans* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1). <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-175>
- Soler-Rivas, C., Möller, A. C., Arpin, N., Olivier, J.-M., & Wichers, H. J. (2001). Induction of a tyrosinase mRNA in *Agaricus bisporus* upon treatment with a tolaasin preparation from *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 58(2), 95–99. <https://doi.org/10.1006/PMPP.2000.0312>
- Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P., & Karlovsky, P. (2015). Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma.

- Environmental Microbiology*, 17(8), 2647–2660. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521>
- Steinhaus, E. A. (1941). A Study of the Bacteria Associated with Thirty Species of Insects. *Journal of Bacteriology*, 42(6). <https://doi.org/10.1128/jb.42.6.757-790.1941>
- Takeuchi, M., & Hatano, K. (1998a). Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3). <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-973>
- Takeuchi, M., & Hatano, K. (1998b). Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3). <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-739>
- Thorn, G. (1996). Molecular genetic characterization of bacterial isolates causing brown blotch on cultivated mushrooms in Japan. *Mycoscience*, 37(4), 409–416. <https://doi.org/10.1007/BF02460997>
- Tsukamoto, T., Murata, H., & Shirata, A. (2002). Identification of Non-Pseudomonad Bacteria from Fruit Bodies of Wild Agaricales Fungi That Detoxify Tolaasin Produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(10), 2201–2208. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2201>
- Tsukamoto, T., Takeuchi, M., Shida, O., Murata, H., & Shirata, A. (2001). Proposal of *Mycetocola* gen. nov. in the family *Microbacteriaceae* and three new species, *Mycetocola saprophilus* sp. nov., *Mycetocola tolaasinivorans* sp. nov. and *Mycetocola lacteus* sp. nov., isolated from cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3). <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-937>
- Tsukamoto, Takanori. (1998). Isolation of a Gram-positive bacterium effective in suppression of brown blotch disease of cultivated mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus*, caused by *Pseudomonas tolaasii*. *Mycoscience*, 39(3). <https://doi.org/10.1007/BF02464008>
- Tsukamoto, Takanori, Murata, H., & Shirata, A. (2002). Identification of Non-Pseudomonad Bacteria from Fruit Bodies of Wild Agaricales Fungi That Detoxify Tolaasin Produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(10), 2201–2208. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2201>
- Woude, A. D. Van Der, Mahendran, K. R., Ummels, R., Piersma, R., Pham, T. V., Punder, K. De, Wel, D., Winterhalter, M., Luirink, J., Bitter, W., & Edith, N. G. (n.d.). *channel activity*.
- Yang, X., Huang, E., & Yousef, A. E. (2017). Brevibacillin, a cationic lipopeptide that binds to lipoteichoic acid and subsequently disrupts cytoplasmic membrane of

Staphylococcus aureus. *Microbiological Research*, 195, 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.002>

Yokota, A., Takeuchi, M., & Weiss, N. (1993). Proposal of two new species in the genus *Microbacterium*: *Microbacterium dextranolyticum* sp. nov. and *Microbacterium aurum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(3).
<https://doi.org/10.1099/00207713-43-3-549>

Zlamala, C., Schumann, P., Kämpfer, P., Valens, M., Rosselló-Mora, R., Lubitz, W., & Busse, H.-J. (2002). *Microbacterium aerolatum* sp. nov., isolated from the air in the “Virgilkapelle” in Vienna. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4). <https://doi.org/10.1099/00207713-52-4-1229>

謝辞

本論文は筆者が東京農業大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。本学応用生物科学部農芸化学科 教授 横田健治先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

同学科教授 五十君静信先生、並びに生命科学部 分子微生物学科 對馬誠也先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

本学農学部農学科教授 篠原弘亮先生には副査としてご助言を頂くと共に、本研究で使用した *Microbacterium* sp. K3-5 株、*Microbacterium* 属基準株 30 菌株、*Pseudomonas tolaasii* 814 株を供与して頂いた。ここに感謝の意を表す。大分県農林水産研究指導センター林業研究部有馬忍博士には本研究で使用した *Flammulina velutipes* 1203A 株を供与して頂いた。ここに感謝の意を表す。

本学農芸化学科応用微生物学研究室准教授 梶川揚申先生ならびに、博士研究員 檜木真吾博士には本論文の作成にあたり、多くのご助言を頂いた。ここに感謝の意を表す。本学農芸化学科教授・辻井良政先生、同学科准教授 須恵雅之先生ならびに、本学農芸化学専攻 博士後期課程 3 年小山翔太さんには LC-MS および LC-MS/MS 解析を行うにあたり、多大なるご指導、ご協力頂いた。ここに感謝の意を表す。

本学生物応用化学科および農芸化学科応用微生物学研究室の卒業生である藤那津乃さん、安達翔子さん、安達真菜さん、高橋由衣さん、高山彩さん、平安杏奈さん、榎大樹さん、川久保利沙さん、笹沼花梨さん、升本蒼さんには本研究論文執筆にあたり共に実験を行って戴いた。深く感謝する。さらに本学農芸化学専攻応用微生物学研究室 博士後期課程 3 年 鈴木駿也さん、Calra Suzuki さんには研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴いた。ここに感謝の意を表す。

本研究は、東京農業大学博士支援テーマ重点化プロジェクト（2020 年度）および大学院博士後期課程研究支援制度（2018、2019 年度）、公益社団法人報農会育英費（2020 年度）の支援を受けて実施した。

最後に、本大学大学院農芸化学専攻を修了するにあたり、人一倍長い学生生活を支えてもらった祖母、父、母、姉に感謝します。