

学内プロジェクト研究成果報告  
農大発 食・農・環境の未来を豊かにする実学研究

# きのご細菌病の病原因子を生分解する新規生物防除機構

横田 健治

東京農業大学 応用生物化学部 農芸化学科



東京農業大学  
農芸化学科

# 共同研究者

篠原 弘亮 教授

東京農業大学 農学部 農学科



# *Pseudomonas tolaasii*によるきのこ細菌病害



病原菌：*Pseudomonas tolaasii*

対象：各種きのこ

症状：子実体の褐変、軟腐、へこみ

## 国内

- 栽培きのこ類の生産額は2,256億円<sup>1)</sup>
- 国内においては本病害に対する化学農薬の登録は無く、野外で栽培を行うシイタケの原木栽培ではその管理がままならない状況<sup>2)</sup>

## 世界

- 栽培きのこ類の世界市場は167億USD (1兆7,000億円規模)<sup>3)</sup>
- 世界各国のマッシュルーム栽培で多く確認され、特にヨーロッパ諸国での発生率は作物重量のおおよそ10~15%、多いときには**50%を超える**<sup>4)</sup>

1) 農林水産省, 2018; 2) 有馬ら, 2019; 3) <https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/mushroom-cultivation.asp>; 4) Osdaghi E et al., 2019

# *Pseudomonas tolaasii*によるきのこ細菌病害

## 発病メカニズム

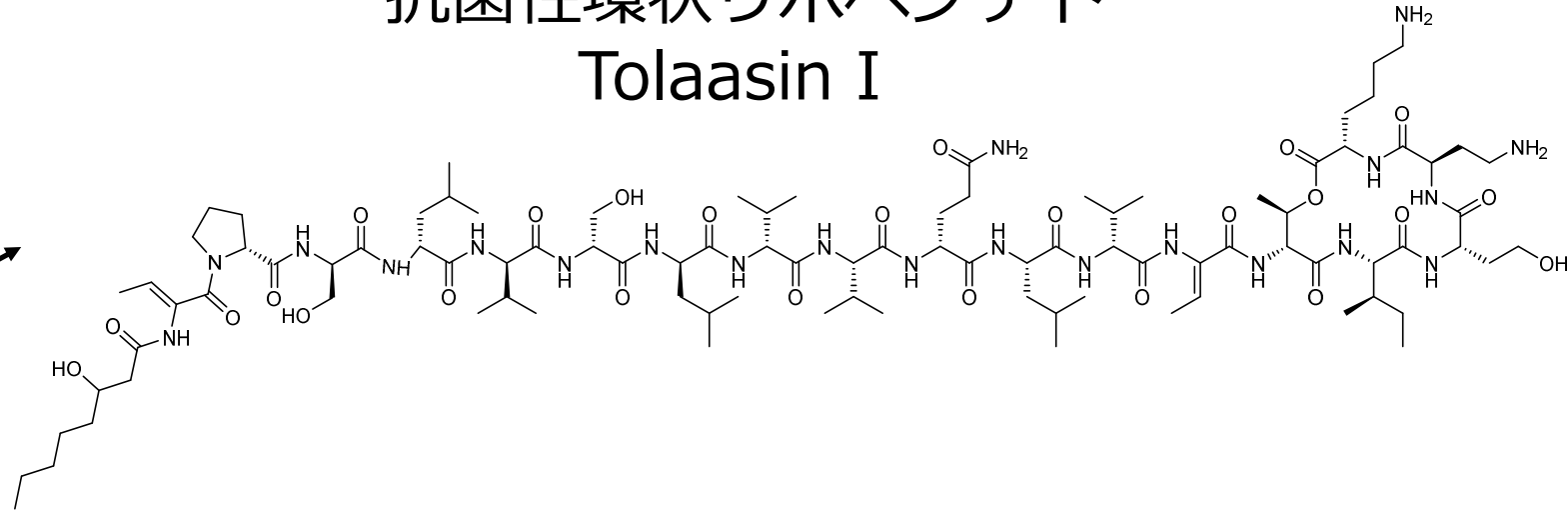
*Pseudomonas tolaasii*



分泌



抗菌性環状リポペプチド  
Tolaasin I



Tolaasin生合成遺伝子破壊株は、きのこに対する病原性を失う

Henkels et al. 2014



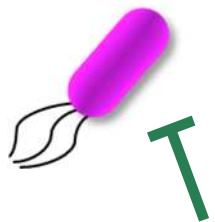
**Tolaasinがきのこ腐敗病の病原因子**



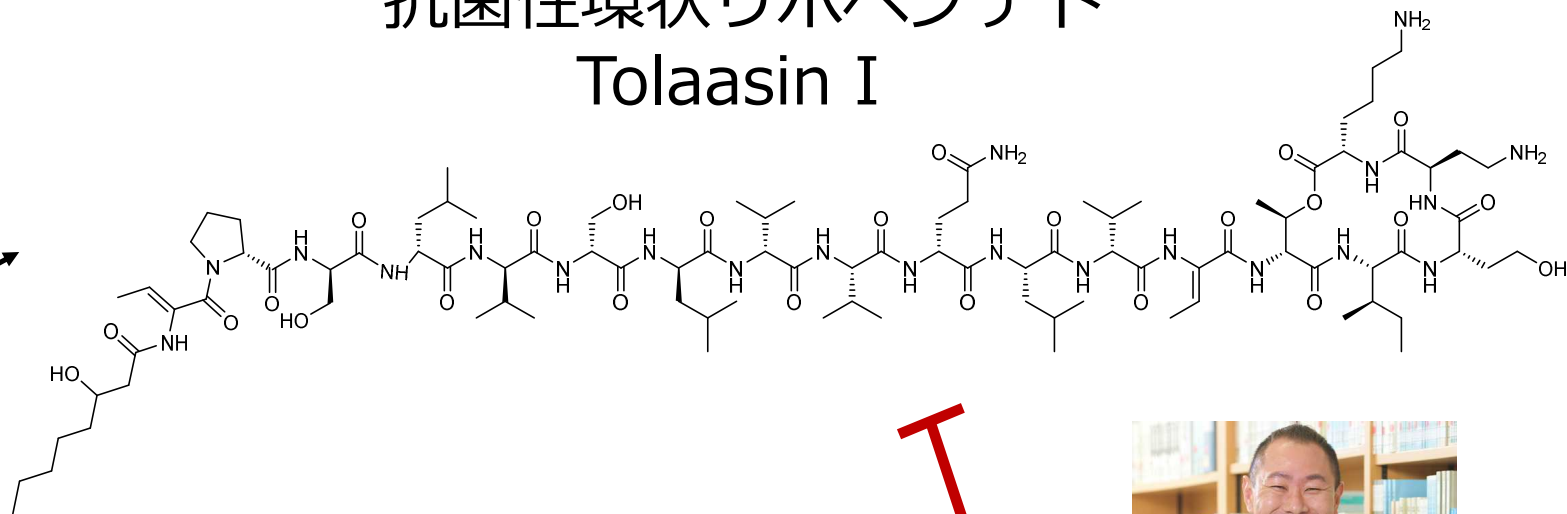
# *Pseudomonas tolaasii*によるきのご細菌病害

## 発病メカニズム

*Pseudomonas tolaasii*



分泌



## 従来の生物防除戦略

- 拮抗細菌による生育阻害

Sahin . 2005



- バクテリオファージによる溶菌

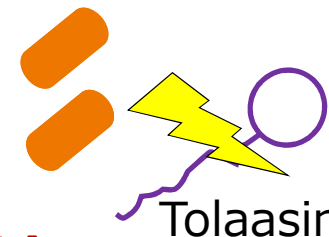
Nguyen et al.  
2012



## 新たな生物防除戦略

- 毒素tolaasinの直接的な解毒
- 薬剤耐性菌の出現がない

→ 生物防除剤として新しい概念



Tolaasin

# きのこ細菌病の病原因子を生分解する新規生物防除機構

- Tolaasin解毒細菌の探索
- K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構
- *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性
- *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

# きのこ細菌病の病原因子を生分解する新規生物防除機構

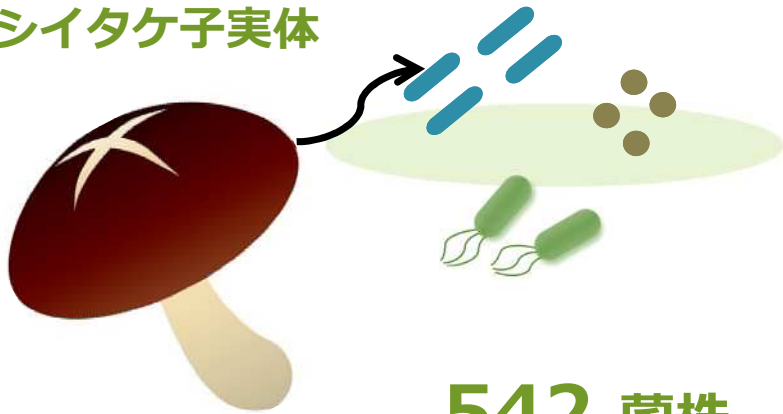
- Tolaasin解毒細菌の探索
- K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構
- *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性
- *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



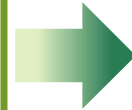
# Tolaasin解毒細菌の探索

## 細菌の分離

健全な  
シイタケ子実体



542 菌株

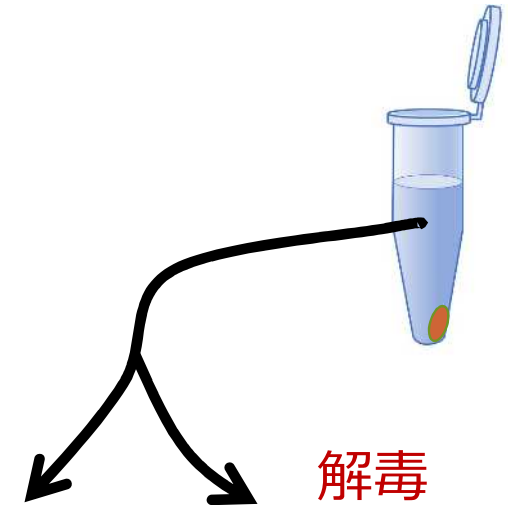


## Tolaasin解毒能試験

Tolaasin



+



解毒



ジャガイモ塊茎切片  
解毒細菌のスクリーニング

# Tolaasin解毒細菌の探索

日本きのこ学会誌, Vol. 25(4) 129-133, 2018  
Copyright © 2018, 日本きのこ学会

論 文

## 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

横田健治<sup>1)</sup>・七海隆之<sup>2)</sup>・富田 駿<sup>1)</sup>・キム オッキョン<sup>3)</sup>  
根岸寛光<sup>3)</sup>・篠原弘亮<sup>3)\*</sup>

<sup>1)</sup> 東京農業大学応用生物科学部 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

<sup>2)</sup> 福島県農業総合センター果樹研究所 〒960-0231 福島県福島市飯坂町平野字檀の東 1

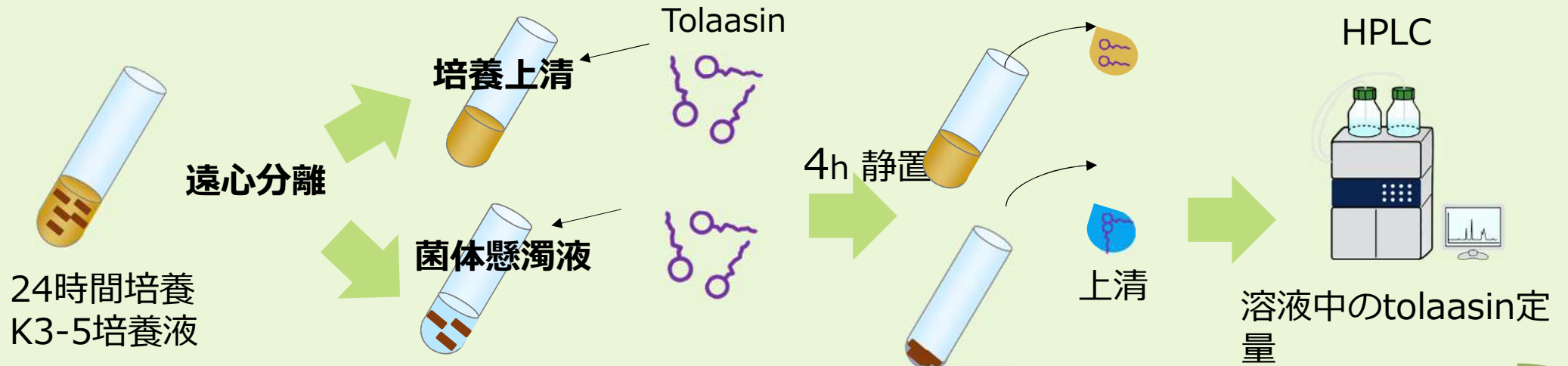
<sup>3)</sup> 東京農業大学農学部 〒243-0034 神奈川県厚木市船子 1737

***Microbacterium* sp. K3-5を含む8属12菌株に  
tolaasin解毒活性を確認**

# きのこ細菌病の病原因子を生分解する新規生物防除機構

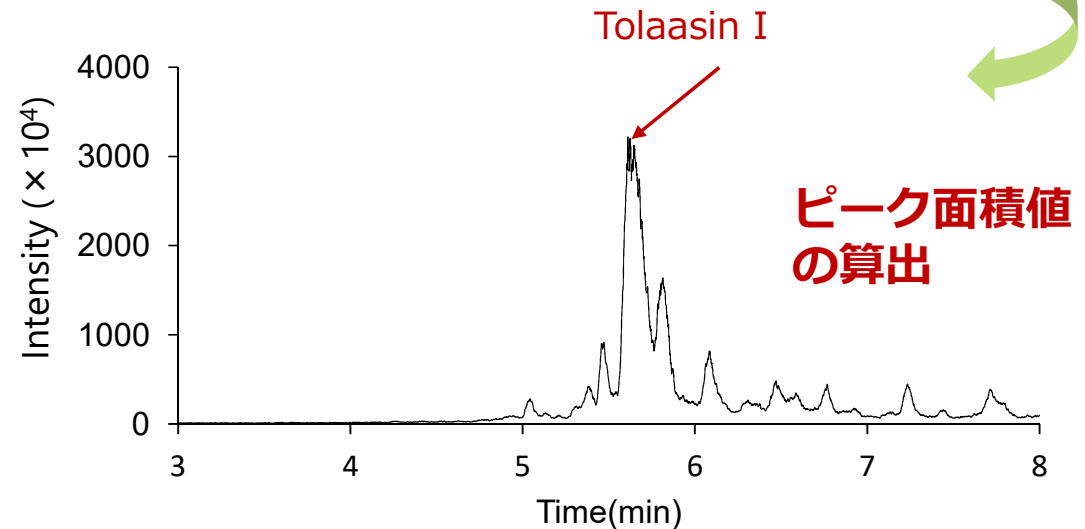
- Tolaasin解毒細菌の探索
- K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構
- *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性
- *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

# K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構

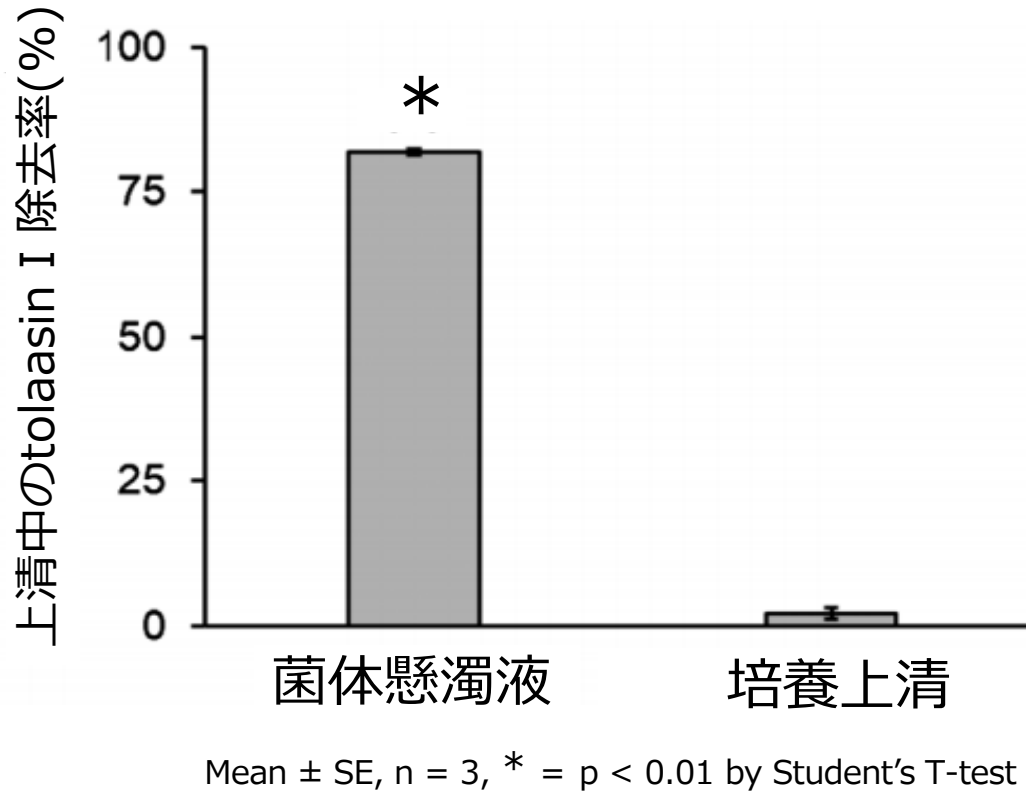


上清中のtolaasin I 除去率  
(%)

$$= 100 - \frac{\text{菌体処理後tolaasin Iピーク面積値}}{\text{菌体処理前tolaasin Iピーク面積値}} \times 100$$



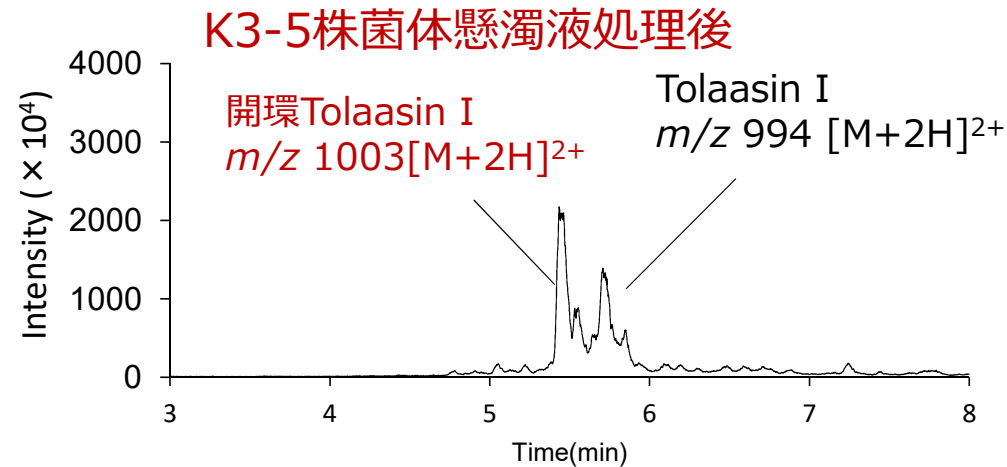
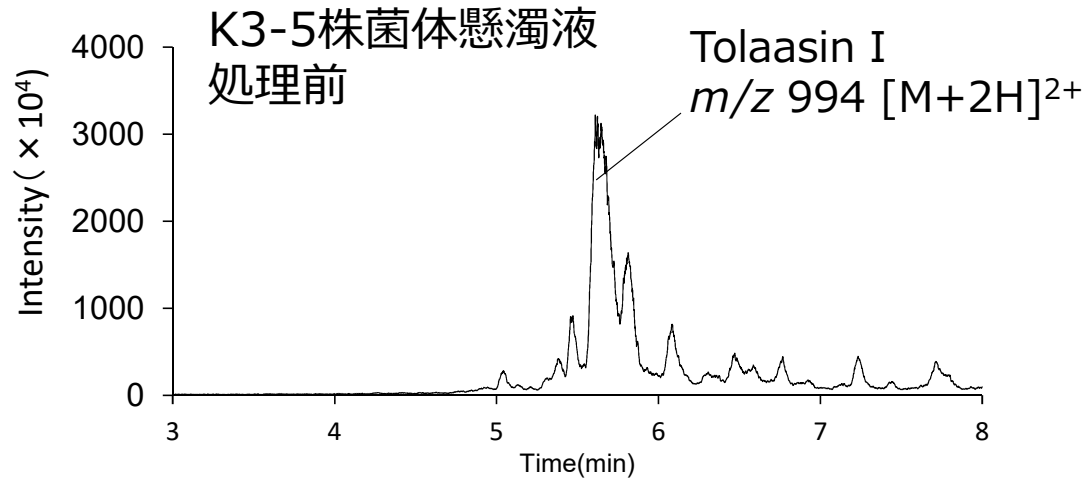
# K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構



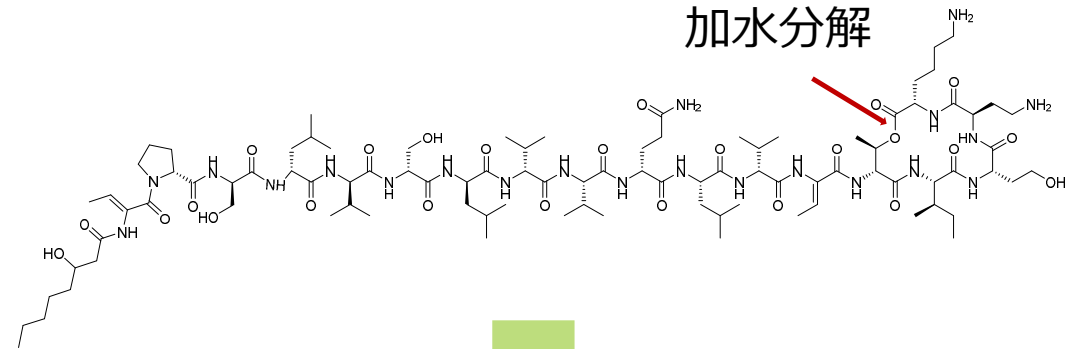
- 
- 菌体外にtolaasin解毒因子を分泌しない
  - 菌体でtolaasinを解毒する

# K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構

## LC-MSクロマトグラム

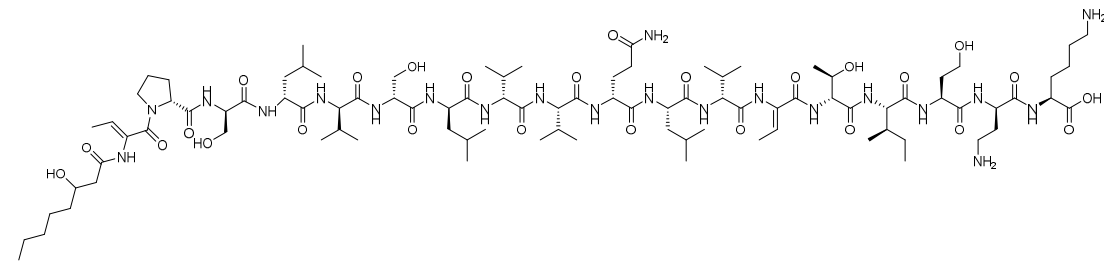


Tolaasin I  
 $m/z$  994  $[M+2H]^{2+}$



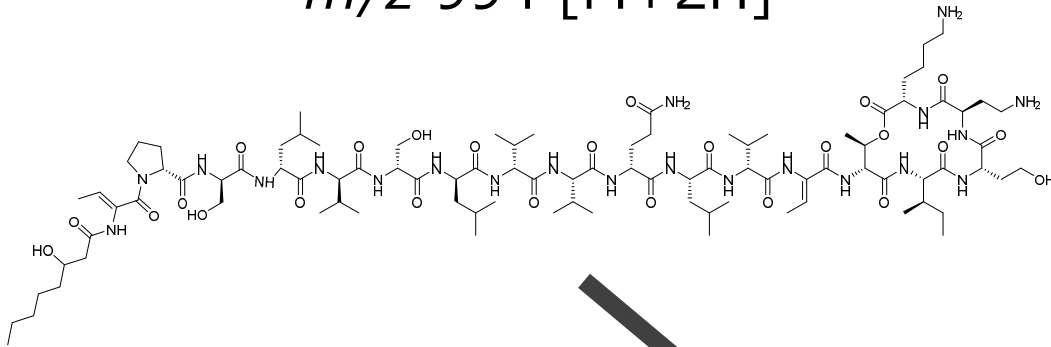
開環Tolaasin I  
 $m/z$  1003  $[M+2H]^{2+}$

毒性なし

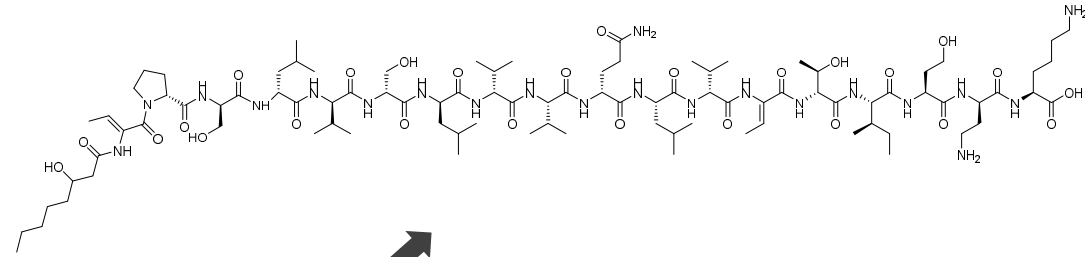


# K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構

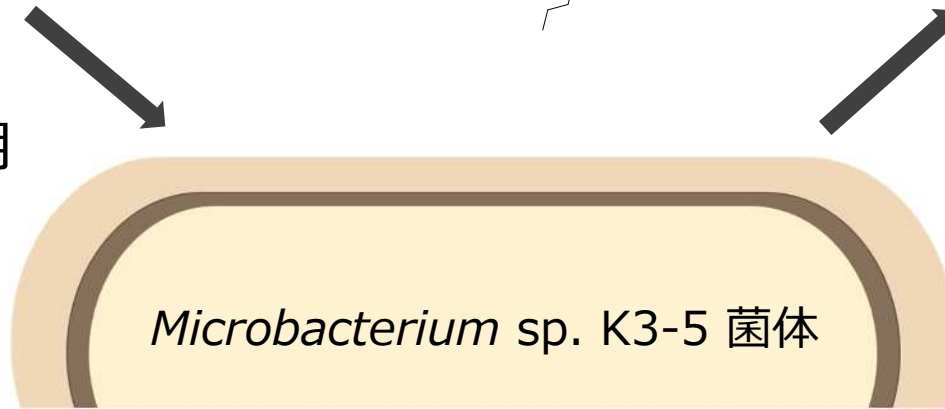
Tolaasin I  
 $m/z$  994  $[M+2H]^{2+}$



開環Tolaasin I  
 $m/z$  1003  $[M+2H]^{2+}$



菌体との相互作用



エステル結合の加水分解  
による開環

# K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構

BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, 2018  
<https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1460575>



Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group

NOTE



## Detoxification process of tolaasins, lipodepsipeptides, by *Microbacterium* sp. K3-5

Shun Tomita<sup>a</sup>, Masayuki Sue<sup>a</sup>, Akinobu Kajikawa<sup>a</sup>, Shizunobu Igimi<sup>a</sup>, Hirosuke Shinohara<sup>b</sup> and Kenji Yokota<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan; <sup>b</sup>Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Japan



# きのこ細菌病の病原因子を生分解する新規生物防除機構

- Tolaasin解毒細菌の探索
- K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構
- *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性
- *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

# *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性

K3-5株が持つtolaasin解毒活性が*Microbacterium*属に共通した特徴であるか？

| Species                           | Strain                   | Species                   | Strain                   |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <i>M. aerolatum</i>               | NBRC 103071 <sup>T</sup> | <i>M. keratanolyticum</i> | NBRC 13309 <sup>T</sup>  |
| <i>M. arabinogalactanolyticum</i> | NBRC 14344 <sup>T</sup>  | <i>M. ketosireducens</i>  | NBRC 14548 <sup>T</sup>  |
| <i>M. arborescens</i>             | NBRC 3750 <sup>T</sup>   | <i>M. kitamiense</i>      | NBRC 16414 <sup>T</sup>  |
| <i>M. aurantiacum</i>             | NBRC 15234 <sup>T</sup>  | <i>M. liquefaciens</i>    | NBRC 15037 <sup>T</sup>  |
| <i>M. aurum</i>                   | NBRC 15204 <sup>T</sup>  | <i>M. luteolum</i>        | NBRC 15074 <sup>T</sup>  |
| <i>M. awajiense</i>               | NBRC 103565 <sup>T</sup> | <i>M. marinilacus</i>     | NBRC 104188 <sup>T</sup> |
| <i>M. barkeri</i>                 | NBRC 15036 <sup>T</sup>  | <i>M. maritypicum</i>     | NBRC 15779 <sup>T</sup>  |
| <i>M. chocolatatum</i>            | NBRC 3758 <sup>T</sup>   | <i>M. oleivorans</i>      | NBRC 103075 <sup>T</sup> |
| <i>M. deminutum</i>               | NBRC 101278 <sup>T</sup> | <i>M. oxydans</i>         | NBRC 15586 <sup>T</sup>  |
| <i>M. dextranolyticum</i>         | NBRC 14592 <sup>T</sup>  | <i>M. paraoxydans</i>     | NBRC 103076 <sup>T</sup> |
| <i>M. flavum</i>                  | NBRC 103923 <sup>T</sup> | <i>M. phyllosphaerae</i>  | NBRC 103077 <sup>T</sup> |
| <i>M. foliorum</i>                | NBRC 103072 <sup>T</sup> | <i>M. resistens</i>       | NBRC 103078 <sup>T</sup> |
| <i>M. gubbeenense</i>             | NBRC 103073 <sup>T</sup> | <i>M. saperdae</i>        | NBRC 15038 <sup>T</sup>  |
| <i>M. hominis</i>                 | NBRC 15708 <sup>T</sup>  | <i>M. schleiferi</i>      | NBRC 15075 <sup>T</sup>  |
| <i>M. hydrocarbonoxydans</i>      | NBRC 103074 <sup>T</sup> | <i>M. testaceum</i>       | NBRC 12675 <sup>T</sup>  |
| <i>M. imperiale</i>               | NBRC 12610 <sup>T</sup>  |                           |                          |

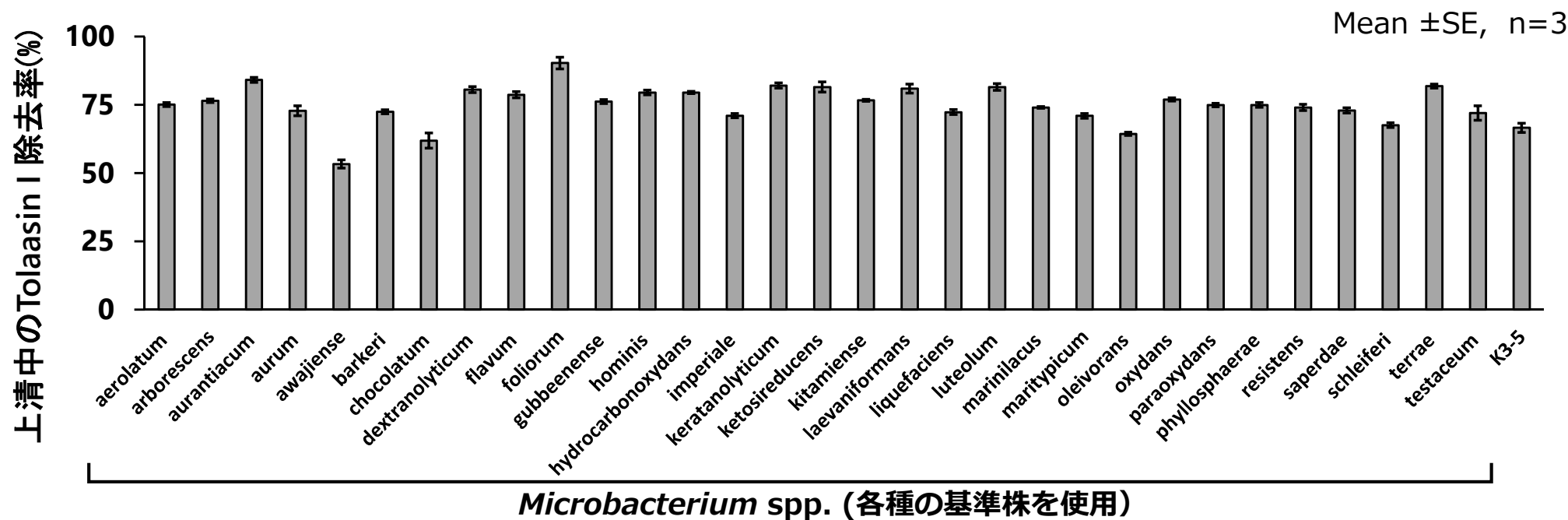
# Microbacterium属基準株のtolaasin解毒活性

## 培養上清

すべての菌株において、tolaasinは除去されなかった

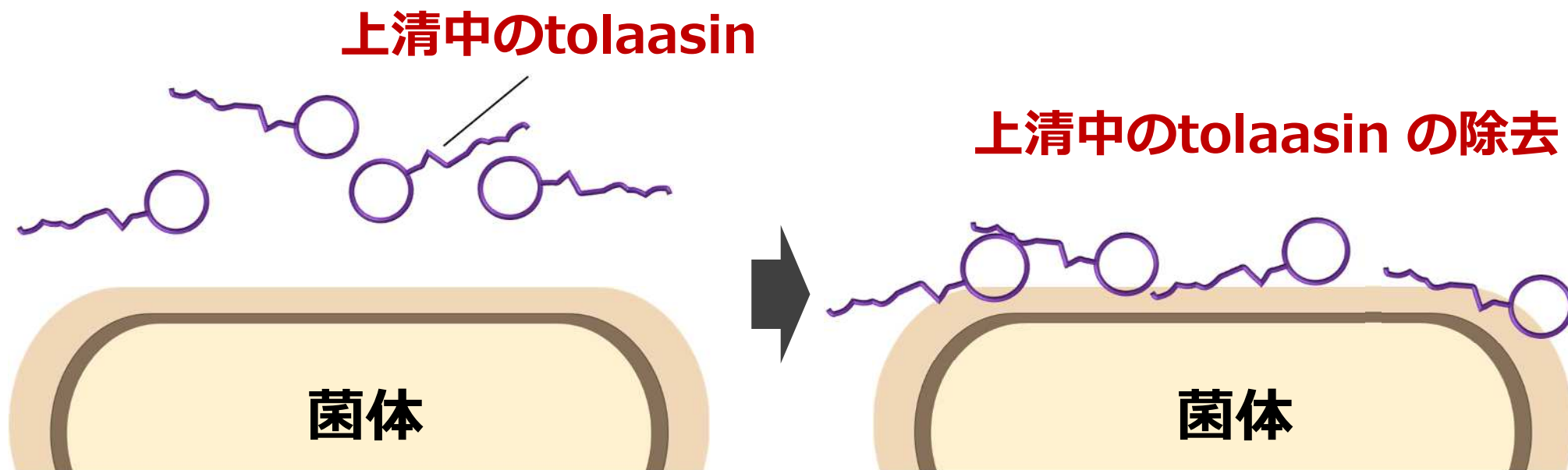
## 菌体懸濁液

すべての菌株において、上清中のtolaasinが除去された



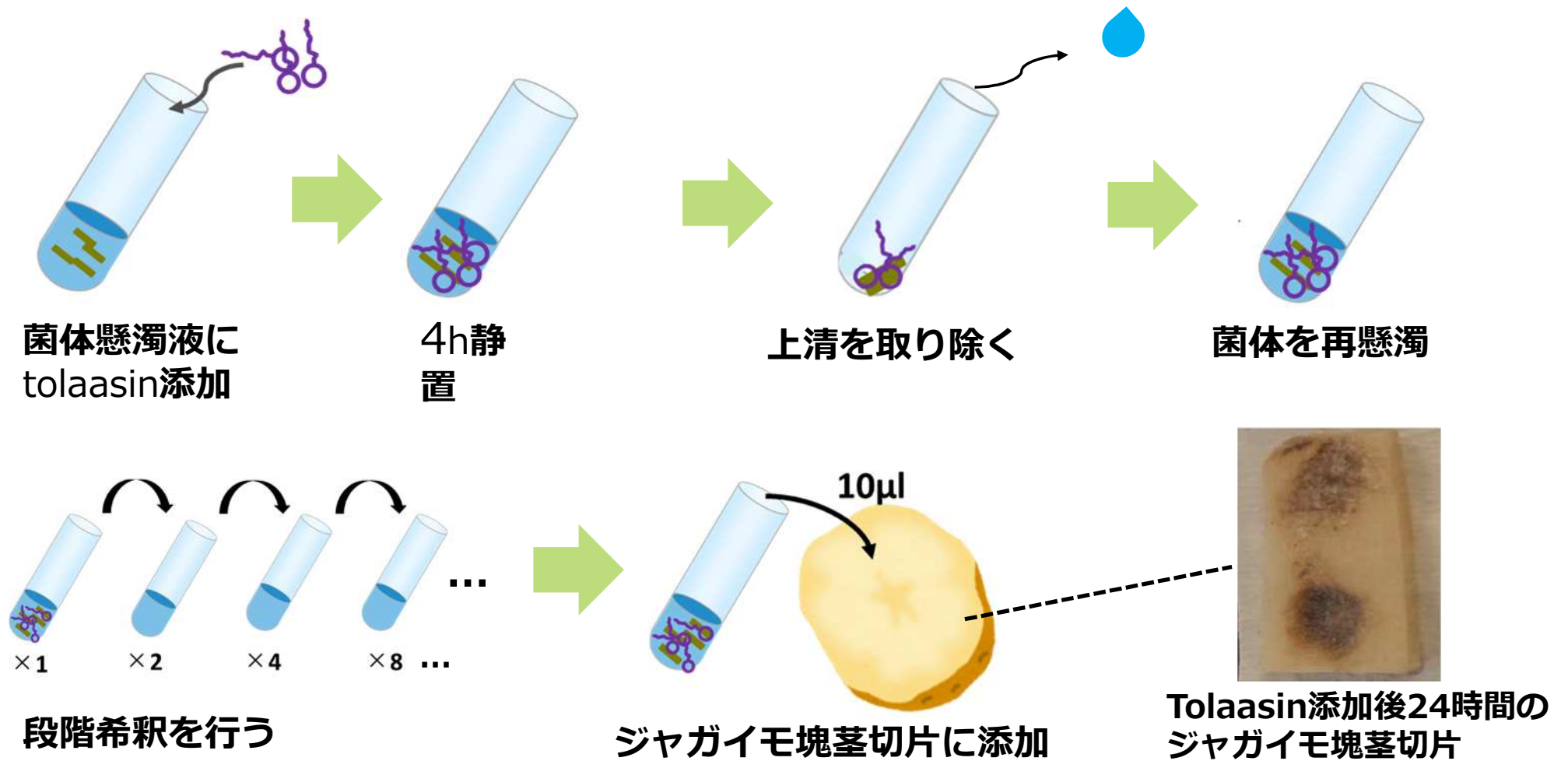
# *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性

## *Microbacterium* 属菌体にtolaasin が吸着する



菌体へのtolaasin の吸着・除去 = 解毒？

# Microbacterium属基準株のtolaasin解毒活性



# Microbacterium属基準株のtolaasin解毒活性

褐変

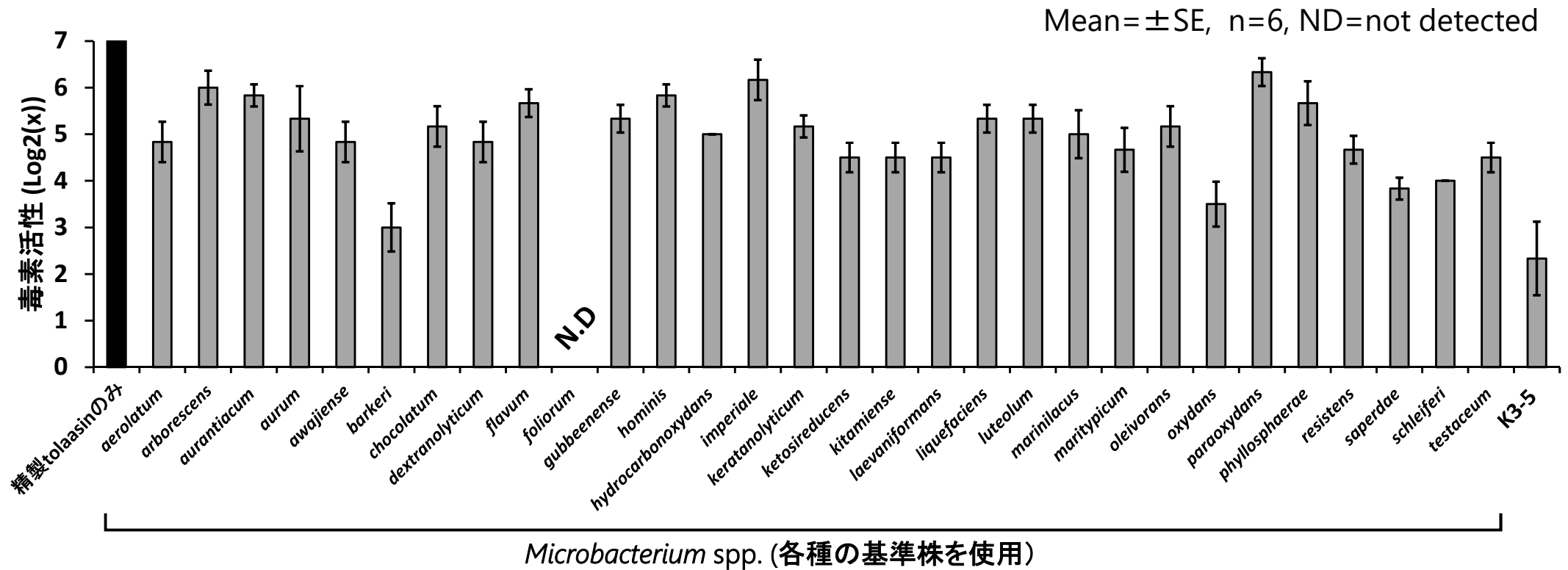
最小褐変消失濃度  
(精製tolaasin: 2 $\mu$ M)



|                      |            |            |            |            |             |             |             |              |              |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 希釈倍率                 | $\times 1$ | $\times 2$ | $\times 4$ | $\times 8$ | $\times 16$ | $\times 32$ | $\times 64$ | $\times 128$ | $\times 256$ |
| Log <sub>2</sub> (x) | 0          | 1          | 2          | 3          | 4           | 5           | 6           | 7            | 8            |

この方法を用いて、tolaasin処理した菌体の毒素活性を評価した

# Microbacterium属基準株のtolaasin解毒活性



多くの菌株で4時間処理後も tolaasin の毒素活性を保持



# *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性

Tolaasinのみ



*M. foliorum* 菌体  
+ tolaasin



*M. paraoxydans* 菌体  
+ tolaasin



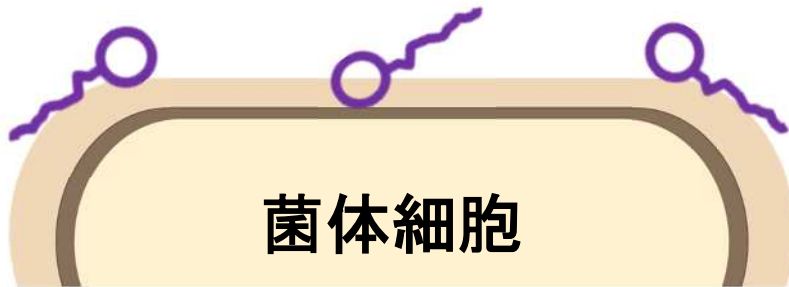
きのこ子実体においても、*M. foliorum*は tolaasin解毒活性を示した



# Microbacterium属基準株のtolaasin解毒活性

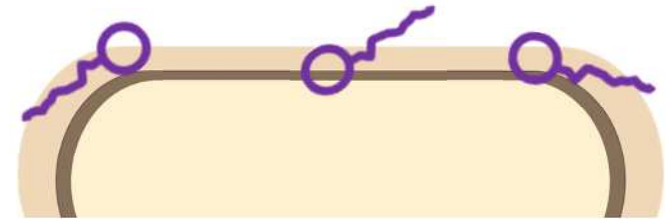
Microbacterium属

菌体への吸着



Tolaasin解毒能なし

毒性保持



生物防除活性 ✕

Tolaasin解毒能あり

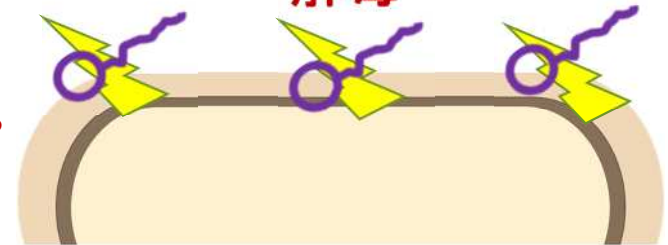
K3-5

*M. barkeri*

*M. oxydante*

*M. foliorum*

解毒



生物防除活性 ○

# *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性

Current Microbiology

<https://doi.org/10.1007/s00284-020-01884-w>



## Adsorption of Tolaasins, the Toxins Behind Mushroom Bacterial Blotch, by *Microbacterium* spp. is Insufficient for Its Detoxification

Shun Tomita<sup>1</sup> · Anna Hirayasu<sup>1</sup> · Akinobu Kajikawa<sup>1</sup> · Shizunobu Igimi<sup>1</sup> · Hirosuke Shinohara<sup>2</sup> · Kenji Yokota<sup>1</sup>

Received: 15 October 2019 / Accepted: 10 January 2020

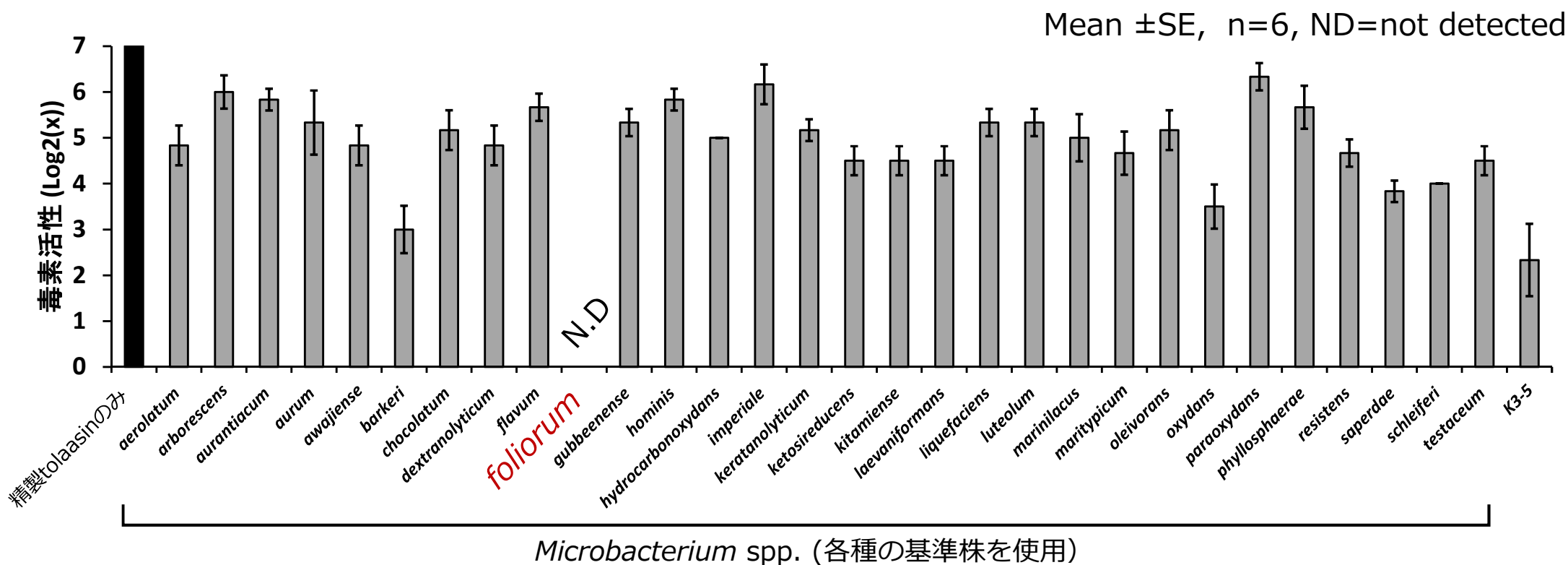
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Tolaasinの菌体への吸着・除去≠解毒

# きのこ細菌病の病原因子を生分解する新規生物防除機構

- Tolaasin解毒細菌の探索
- K3-5のtolaasin解毒活性の局在と解毒機構
- *Microbacterium*属基準株のtolaasin解毒活性
- *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

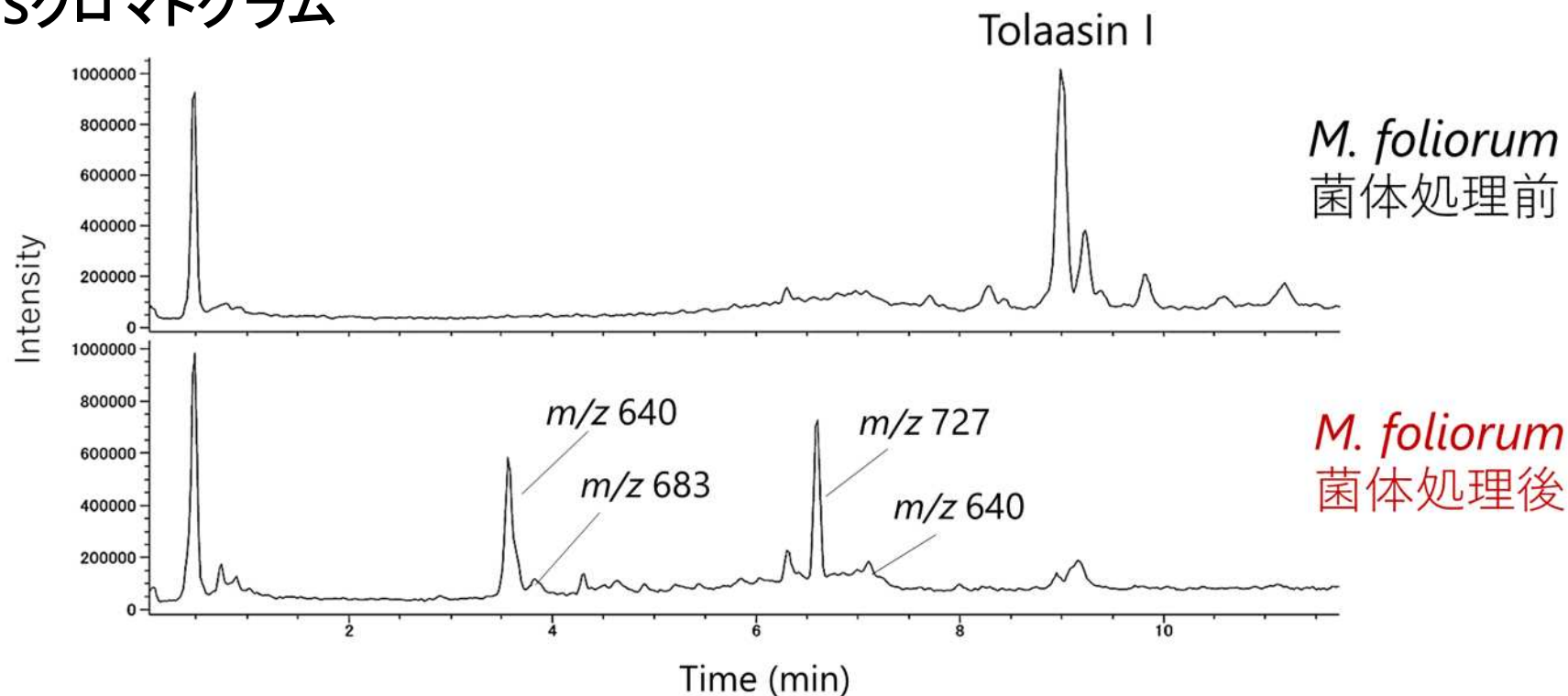
# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



*Microbacterium* 属 基準株30菌株のうち顕著に高い解毒活性を示した  
*M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup> 株について解毒機構を詳細に解析

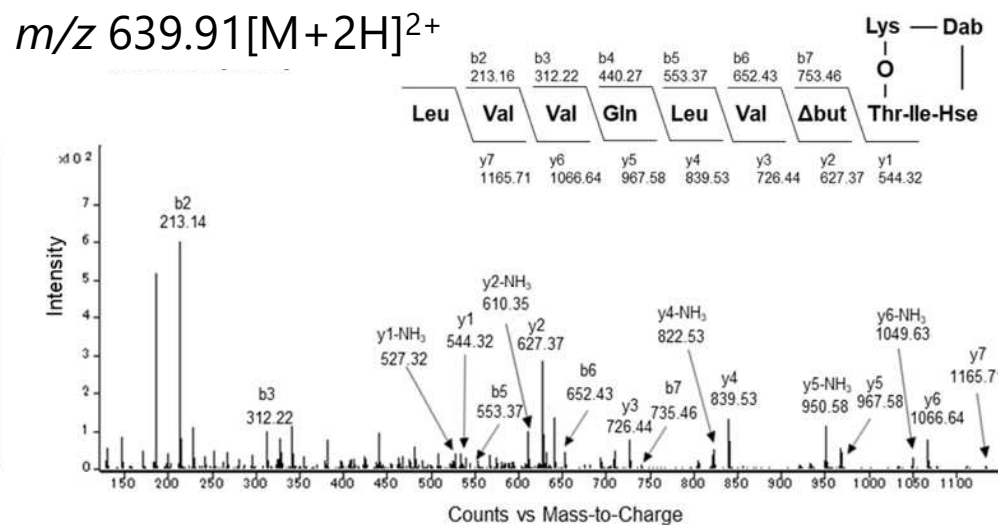
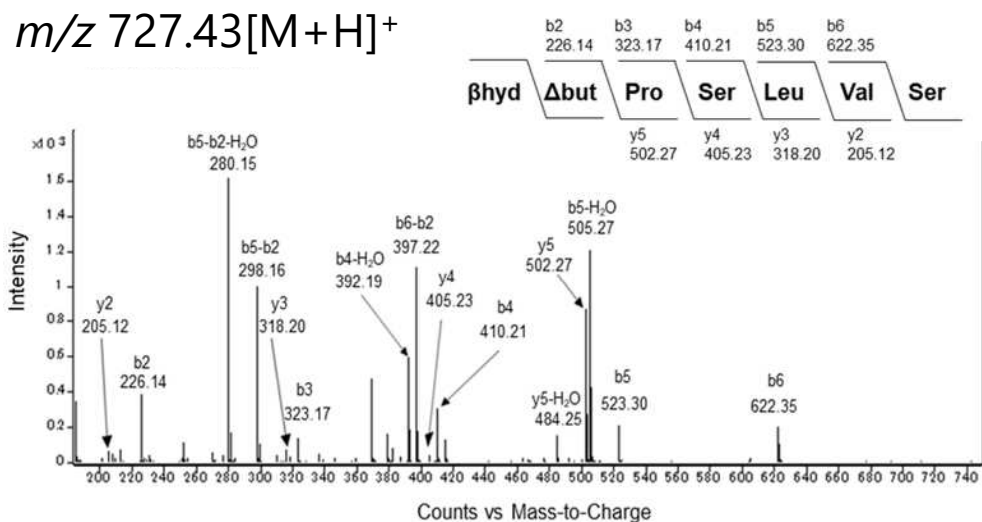
# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

## LC-MSクロマトグラム



菌体処理後上清中にK3-5株とは異なる未同定ピークが検出された

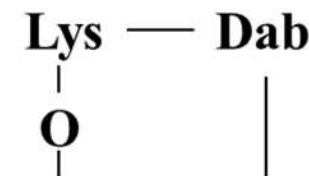
# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



Tolaasinの一次構造

加水分解

$\beta$ hyd- $\Delta$ but-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Glu-Leu-Val- $\Delta$ but-Thr-Ile-Hse

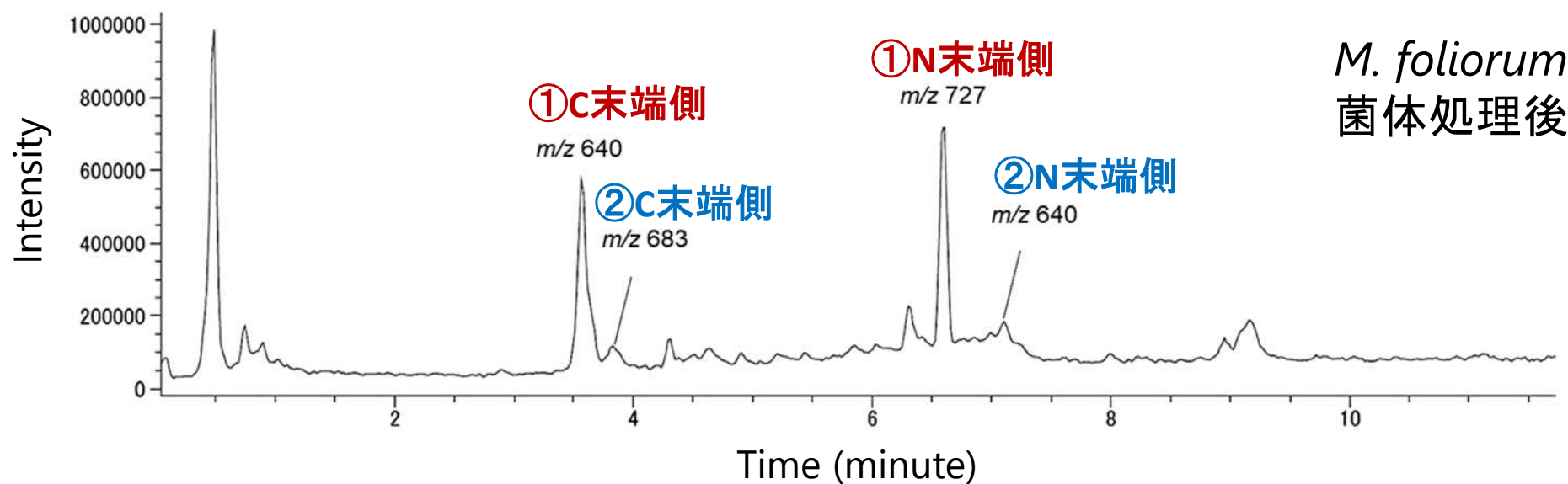


$\beta$ hyd:  $\beta$ -hydroxyoctanoic acid, Dab: 2,4-diaminobutyric acid; Hse: homoserine;  $\Delta$ but: 2,3-dehydro-2-aminobutyric acid

# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



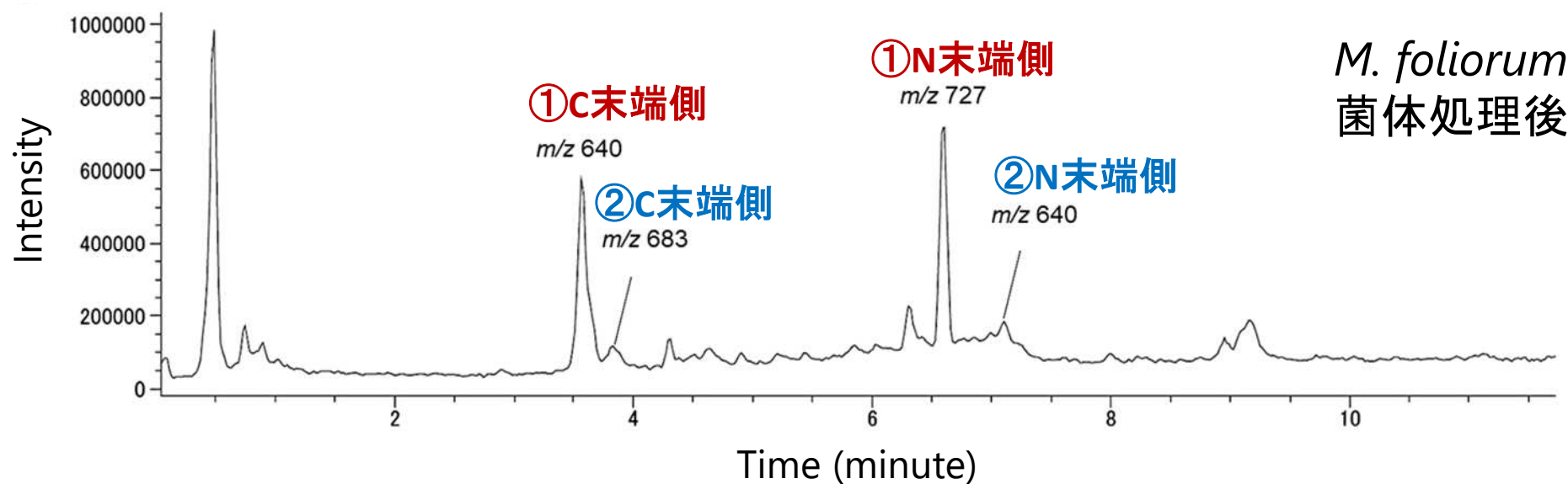
βhyd: β-hydroxyoctanoic acid, Dab: 2,4-diaminobutyric acid; Hse: homoserine; Δbut: 2,3-dehydro-2-aminobutyric acid



# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



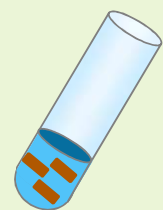
βhyd: β-hydroxyoctanoic acid, Dab: 2,4-diaminobutyric acid; Hse: homoserine; Δbut: 2,3-dehydro-2-aminobutyric acid





# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

## 酵素の可溶化プロトコル



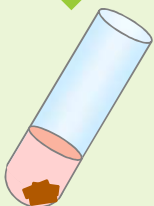
*M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>  
菌体



0.5% Triton X-100  
により懸濁



遠心分離

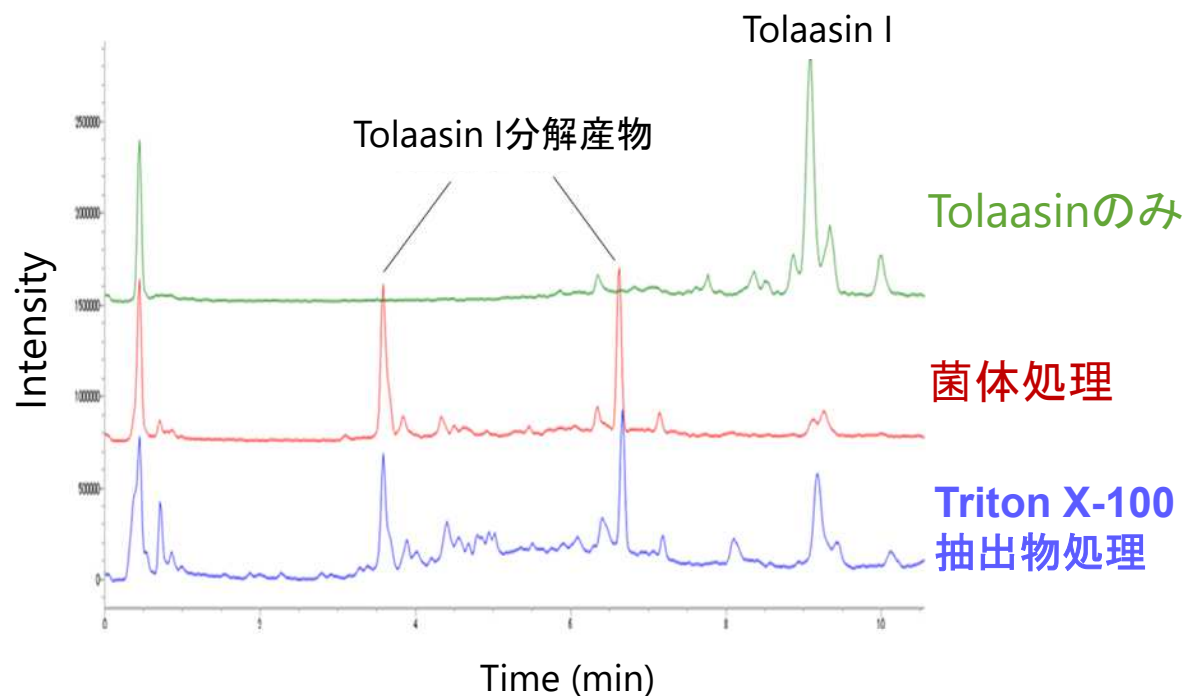


可溶性画分を回収



Tolaasin分解活性評価

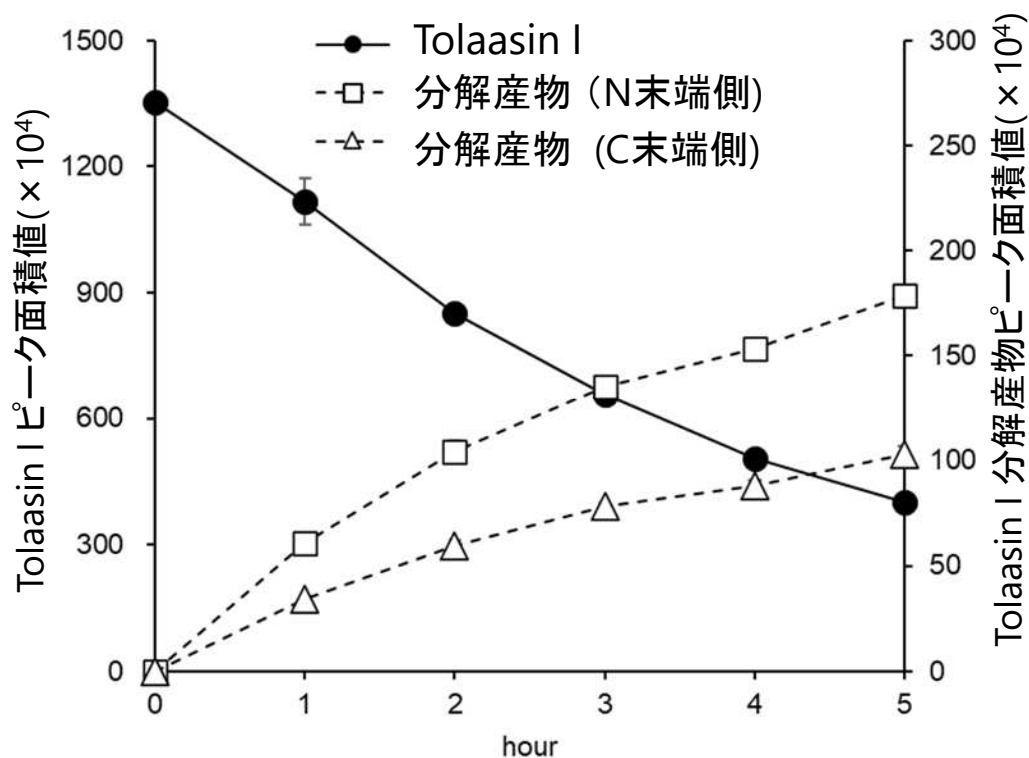
## LC-MSクロマトグラム



菌体のTriton X-100処理によるtolaasin分解酵素の可溶化を確認した

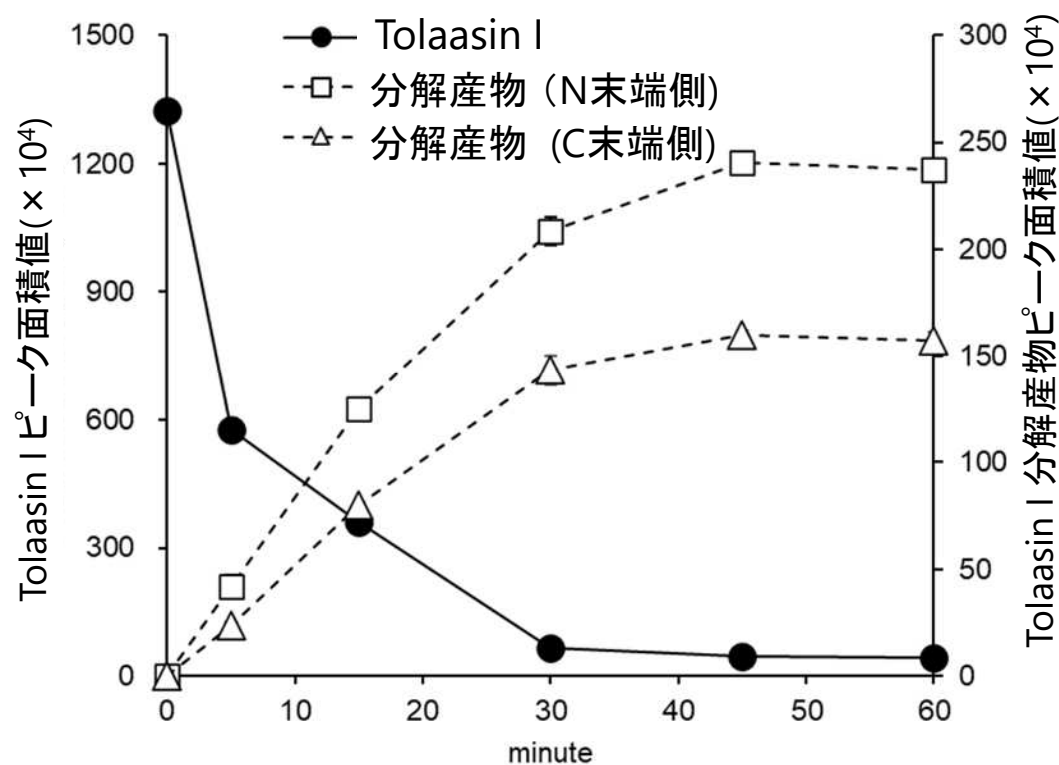
# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構

## 酵素抽出液

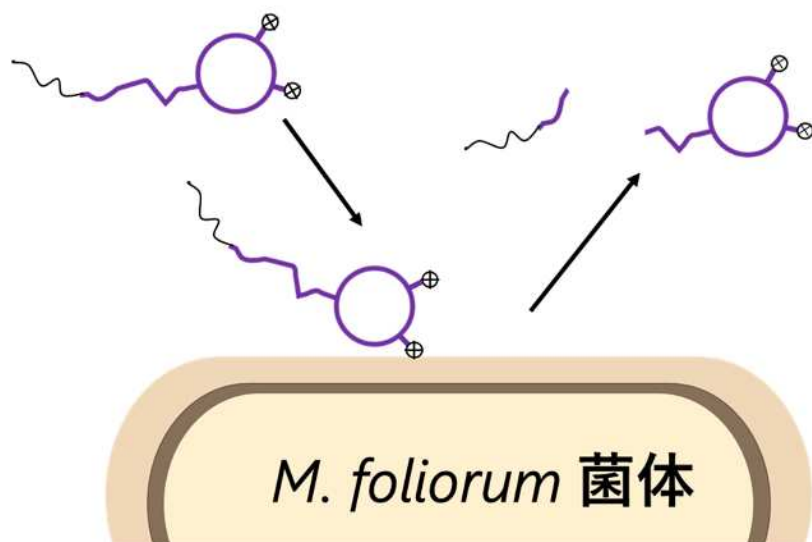


## 菌体懸濁液

Mean ± SE, n = 3



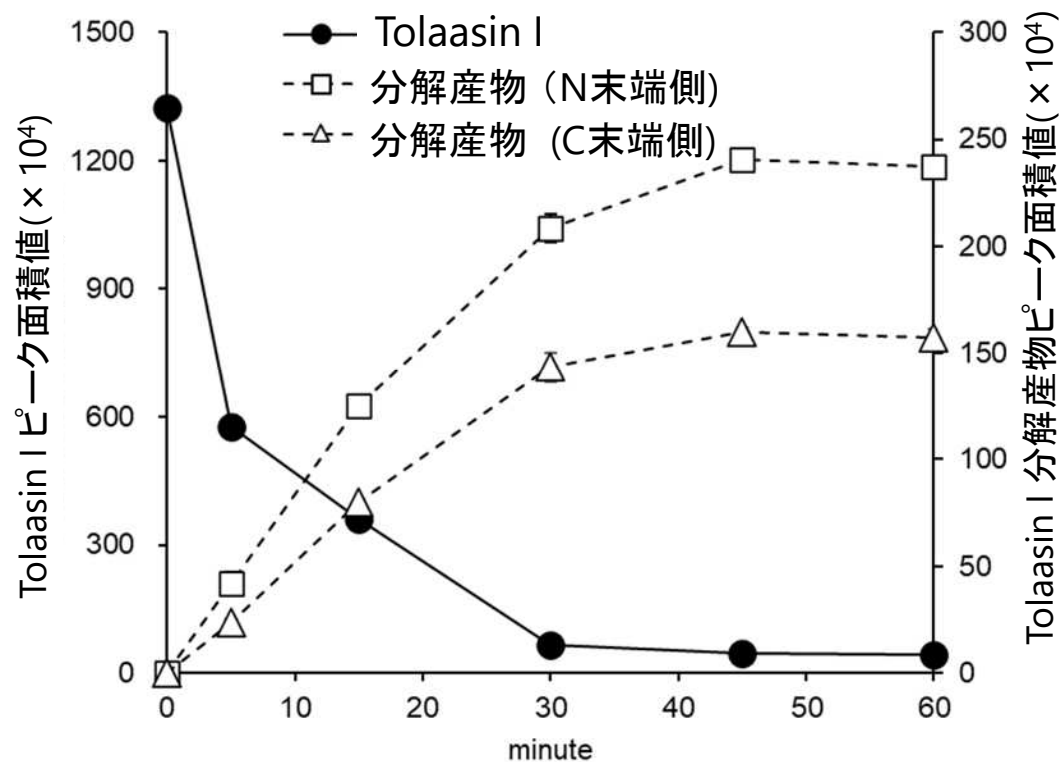
# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



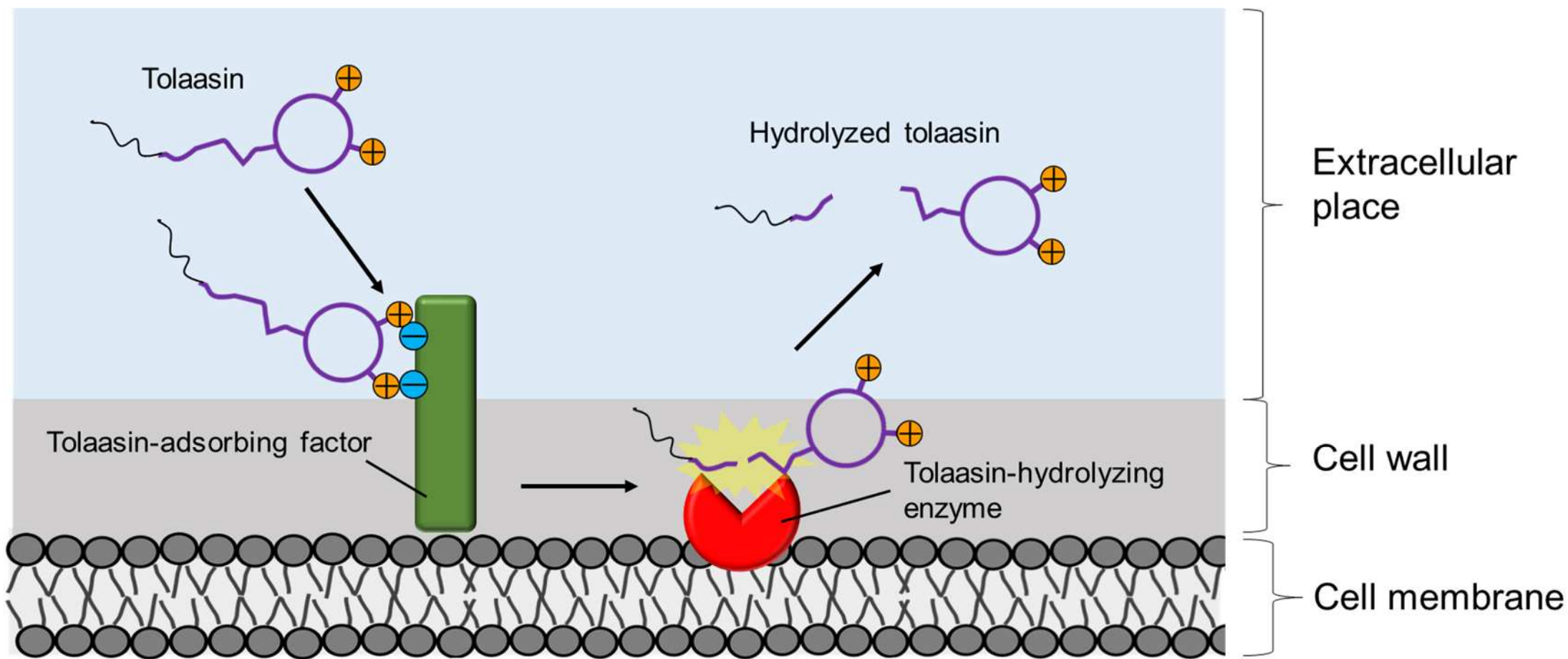
菌体へのtolaasin吸着は加水分解に先立って起こる

## 菌体懸濁液

Mean  $\pm$  SE, n = 3



# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構




# *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>のtolaasin解毒機構



## Research

### Insights into Detoxification of Tolaasins, the Toxins Behind Mushroom Bacterial Blotch, by *Microbacterium foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>

Shun Tomita<sup>1</sup> | Akinobu Kajikawa<sup>1</sup> | Shizunobu Igimi<sup>1</sup> | Hirosuke Shinohara<sup>2</sup> | Kenji Yokota<sup>1,†</sup>  |

# まとめ

● *Microbacterium* sp. K3-5 及び *M. foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup> の tolaasin 解毒機構

- 菌体への高い tolaasin 吸着能
- 菌体での tolaasin 加水分解反応 = tolaasin 解毒能



病原因子の生分解

= 薬剤耐性菌の出現の可能性がない

→ 持続可能なきのか栽培法における防除法として期待

# 謝辞

共同研究者

篠原 弘亮 教授

東京農業大学 農学部 農学科

富田 駿 博士

産業技術総合研究所（東京農業大学大学院農芸化学専攻）

有馬 忍 博士

大分県農林水産研究指導センター

農芸化学科教員

五十君 静信 教授

梶川 揚申 教授

辻井 良政 教授

須恵 雅之 准教授

農学部 農学科 植物病理学研究室の皆さん

応用生物科学部 農芸化学科 応用微生物学研究室の皆さん

# 本発表関連の業績

## 【学術論文】

1. Insights into detoxification of tolaasins, the toxins behind mushroom bacterial blotch, by *Microbacterium foliorum* NBRC 103072<sup>T</sup>. Shun Tomita, Akinobu Kajikawa, Shizunobu Igimi, Hirosuke Shinohara, Kenji Yokota. *PhytoFrontiers*. 2021
2. Adsorption of Tolaasins, the Toxins Behind Mushroom Bacterial Blotch, by *Microbacterium* spp. is Insufficient for Its Detoxification. Tomita S, Hirayasu A, Kajikawa A, Igimi S, Shinohara H, Yokota K. *Curr Microbiol*. 2020 Jun;77(6):910-917. doi: 10.1007/s00284-020-01884-w
3. Detoxification process of tolaasins, lipodepsipeptides, by *Microbacterium* sp. K3-5. Tomita S, Sue M, Kajikawa A, Igimi S, Shinohara H, Yokota K. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2018 Aug;82(8):1455-1458. doi: 10.1080/09168451.2018.1460575
4. 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. 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. *日本きのこ学会誌* 25(4) 129 - 133 2018

## 【解説】

きのこを褐変化させる毒素tolaasinを解毒する細菌 横田健治・富田駿・篠原弘亮 *バイオサイエンスとインダストリー* 79 ( 3 ) 214 - 215 2021年05月

## 【受賞】

富田 駿 2019 (平成31) 年度 日本植物病理学会 学生優秀発表賞