

最近の PGPR (植物生育促進性根圏細菌) 研究の現状と展望

福井県立大学生物資源開発研究センター おか もと ひろし
岡 本 博

はじめに

第3回国際植物生育促進性根圏細菌 (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: PGPR) ワークショップが、1994年3月7～11日、オーストラリアのアデレード市で、23か国から100名以上が出席して開催された。今回このワークショップに参加する機会を得たので、そこで発表された88の研究課題のうち私が理解でき、かつ、興味を持った報告について、会場での発表と、RYDER et al. (1994) によって編集された Proceedings をもとに分野別に紹介したい。

I PGPRの植物生育促進効果

BACKMAN et al. (Part 1: 3) は、200万 ha にも及ぶ大きな圃場で実施した試験結果を報告している。*Bacillus subtilis* GB03 を10品種のワタ種子にコーティングすることで、*Rhizoctonia* に起因する苗立枯病と *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* による苗萎ちょう病の発生を同時に防除した。土壌殺菌剤 (Metalaxyl, PCNB, Carboxin) と組み合わせて種子処理したとき、9品種で増収が確認され、平均すると13.2%増となった。また、BRANNEN et al. (Part 1: 83) によると、GB03株は、*F. solani* に起因するワタ萎ちょう病にも防除効果を示したと報告している。

Mew et al. (Part 1: 9) は、イネの紋枯病と、いもち病に対して、蛍光性 pseudomonads, 非蛍光性 pseudomonads, 及び *Bacillus* spp. を供試した。この研究は、アジアの国々 (中国, インド, インドネシア, 韓国, マレーシア, タイ, フィリピン, ベトナム, IRRI) の間で情報交換しながら実施された。乾期と雨期による気象条件の違いや、各国間の土壌条件の違いなどによって、成果にばらつきがあり、一貫した評価が得られなかった。

Wei et al. (Part 1: 70) は、2年以上にわたる圃場試験の結果から、*Pseudomonas putida* 89B-61, *Serratia marcescens* 90-166, *Flavomonas oryzae* INR-5 を、それぞれキュウリ苗に処理したところ、全身抵抗性

が誘導され、*P. syringae* pv. *lachrymans* に起因する斑点細菌病を抑制した。その上、*Colletotrichum orabicalare* の自然感染による炭そ病をも抑制し、結果的にランナーの伸長、展開葉数の増加、果実の増収をもたらした (Wei et al., 1991)。

STEPHENS et al. (Part 1: 57) によると、*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) によるコムギ立枯病は、*P. corrugata* 2140R の土壌灌注処理及び種子コーティング処理により、軽減されることが既に明らかにされているが、ミミズの成虫 (*Aporrectodea trapezoides*) を土壌混入したところ、さらに苗条の生育が促進され、Ggt 無接種区と苗条乾重で同レベルに達した。この原因を、ミミズが PGPR の根面定着能にプラスに関与したためと考察しているが、Ggt 無接種区に、ミミズだけ混入しても、促進効果は得られなかった。

CHANWAY et al. (Part 1: 72) の報告によると、針葉樹 (トウヒ) の根圏土壌及び根組織内から苗生育を促進するエンドファイト、*Hydrogenophaga pseudoflava* M19 を分離した。森林土壌の異なる3地点で M19 株処理による苗生育を検討したところ、いずれの土壌条件下でも、根乾重で14～41%、苗条乾重で2～49%だけ生育が促進された。さらに、栄養条件の貧弱な土壌ほどその効果は顕著であった。

II PGPRの植物生育促進機構

1 抗菌性代謝産物の機能発現における相互関係

P. fluorescens CHAO は、数多くの抗菌性代謝産物を産生し、Ggt に起因するコムギ立枯病をはじめ、各種土壌病害の生物防除と関連作物の生育促進に広く効果を発揮している (DÉFAGO and HASS, 1990)。最近では、タバコ根面へ定着して、TNV に起因するタバコネクロシス病に対する抵抗性を葉に誘導することも報告されている。

MAURHOFFER et al. (Part 2: 117) は、CHAO 株によって生産された各種代謝産物の、植物生育促進や植物病害抑制にかかわる機構を解明するため、代謝産物-宿主植物-病原菌の相互関係を1989～1994年にかけて詳細に研究してきた。すなわち、トランスポゾン Tn5 の挿入により、代謝産物非生産性の突然変異株を作出することから始めた。そして作出された変異株が、病害抑制能を失

活したとき、クローン化された野生型遺伝子の相補性実験により、代謝産物生産と病害抑制能を復活させ、相補性に対応する遺伝子の検出とシーケンスを試みた。

その結果、pyoverdine 非産生変異株 (Pvd-) は、*Thielaviopsis basicola* によるタバコ黒根病と、Ggt 及び *Pythium ultimum* に起因するコムギ立枯病に対し野生株と同じ抑制能を示したが、TNV に起因するタバコネクロシス病に対し誘導抵抗性を喪失した。

pyoluteorin 非産生変異株 (Plt-) は、*P. ultimum* に起因するオランダガラシ苗立枯病に対し発病抑制能を喪失したが、*P. ultimum* に起因するキュウリ苗立枯病とコムギ苗立枯病に対し野生株と同程度の発病抑制効果を示した。

2, 4-diacetylphloroglucinol 非産生変異株 (Phl-) は、*T. basicola* によるタバコ黒根病と Ggt によるコムギ立枯病に対して発病抑制能を喪失したが、*P. ultimum* によるキュウリ立枯病抑制能は保持されていた。

HCN 生産遺伝子 (*hcn*) は、LAVILLE によって検出され、クローン化及びシーケンスされた。*hcn* 遺伝子欠損変異株 (*hcn*-) は、*T. basicola* に起因するタバコ黒根病、*P. ultimum* に起因するキュウリとオランダガラシ苗立枯病、*R. solani* に起因するワタ苗立枯病を抑制したが、*P. ultimum* や *R. solani* に起因するトウモロコシ立枯病と、Ggt、*P. ultimum*、*R. solani* に起因するコムギ立枯病に抑制効果が認められなかった。

LAVILLE et al. (1992) によって、代謝産物である抗生物質及びシアン化物の包括的活性化遺伝子として、*gacA* 遺伝子 (global activator gene of antibiotic and cyanide synthesis) が検出され、クローン化及びシーケンスされた。*gacA* 遺伝子欠損変異株 (*gacA*-) は、HCN、Phl、Plt、protease、そして phospholipase の生合成能が欠損したもので、*T. basicola* によるタバコ黒根病と、*P. ultimum* によるキュウリ苗立枯病の発病抑制能を喪失したが、*P. ultimum* と Ggt によるコムギ立枯病、*P. ultimum* によるトウモロコシ立枯病に対しては野生株と同じ抑制効果が確認された。さらにタバコ葉には TNV 抵抗性も誘導された。*gacA*-株で過剰生成される Pvd の影響を除外するため、*gacA*-株と Pvd-株とのトリペアレント接合 (triparental mating) によって、非蛍光性 *gacA*-株を得た。この変異株は、*P. ultimum* によるコムギ立枯病に対して野生株と同じ発病抑制効果を示した。

CHAO 株染色体 DNA の 22kb 断片を担っている組換えコスミド、pME3090 が導入された CHAO/

pME3090 株がコムギ根圏で Plt 及び Phl の生産を促進した。この抗生物質生産過剰を発現したトランスコンジュガントは、*P. ultimum*、*Phomopsis sclerotioides*、*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* に起因するキュウリの病害と *T. basicola* に起因するタバコ黒根病の発病抑制を強化促進した。しかし、スイートコーン、オランダガラシ、そして一部のタバコの生育には有害に作用した。そこで、代謝産物の生産過剰の原因となるゲノム領域の大きさを、サブクローニングとトランスポゾン Tn1737Cm による突然変異誘発によって、2.3kb まで減らすことができた。その結果、IncP ベクターにクローン化された 2.3kb 断片は、野生株と比べて 6 倍量 (27 µg/ml) の Plt と、1.5 倍量 (7 µg/ml) の Phl を生産することとなり、このクローン化断片に、Plt と Phl の生合成を制御する調節遺伝子が保持されていると考えられた (SCHNIDER et al., Part 2: 120)。

2 誘導全身抵抗性

VAN PEER et al. (1991) は、鉄イオンの競合を排除した実験系において、あらかじめ *P. fluorescens* WCS417 をカーネーションに処理したところ、*F. oxysporum* f. sp. *dianthi* に起因する萎ちょう病が抑制され、ファイトアレキシン蓄積による誘導全身抵抗性 (induced systemic resistance: ISR) が獲得された。しかし、ISR は普通抵抗性品種 Pallas で獲得されたが、感受性品種 Lena では獲得されなかった。さらに、ファイトアレキシン誘導因子が、WCS417 株の外膜に存在するリポ多糖質 (lipopolysaccharides: LPS) に存在することも明らかにした。

LEEMAN et al. (Part 2: 149) は、*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* に起因するダイコン萎ちょう病に対して *P. fluorescens* WCS374 の ISR と LPS との関係を検討した。抵抗性品種から感受性品種まで 6 品種を供試したところ、全品種で発病が WCS374 無処理区よりも約 20~60% だけ強く抑制された。また、WCS374 株及び WCS417 株における LPS の O-抗原側鎖 (O-antigenic side chain) 欠損変異株 (WCS374OA-, WCS417OA-) では ISR が獲得されず発病抑制効果も発揮されなかったことから、ISR 獲得には LPS の O-抗原側鎖が関与していることを明らかにした。

3 エチレン生合成の制御

エチレンは、植物ホルモンの一種で、植物の生長や開花をはじめ多くの生理現象に関与しているが、促進する場合と抑制する場合がある。また、S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM) から 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸塩 (1-aminocyclopropane-

l-carboxylate : ACC) を経て、エチレンが生合成されるのが主たる経路である。GLICK et al. (Part 2 : 150) は、土壤微生物にはまれなデアミナーゼ (deaminase) 活性を持つ *P. putida* GR12-2 を分離した。デアミナーゼとは、ACC をアンモニアと α -ketobutyrate に加水分解する酵素で、その分解産物を窒素源として細菌が利用できる。GR12-2 株から NTG により ACC デアミナーゼ活性を喪失した突然変異株を 3 菌株作出した。これら変異株は、いずれもナタネ幼根の伸長を促進しなかった。その理由を以下のように推察している。野生株は、ナタネの種皮に定着して、発芽中の種子組織内から ACC を取り込み、アンモニアと α -keto-butyrate に加水分解し、それを細菌側が窒素源として利用したため、種子に含まれる ACC レベルが低下した。そのため、幼根でのエチレン生成が減少し、エチレンによる植物生育抑制作用が制御され、結果的に幼根の伸長が促進された。一方、変異株では、ACC を取り込んでもデアミナーゼ活性を喪失しているため利用できず、発芽種子に再び取り込まれ、ACC はすべてエチレン生合成に利用された。この場合、PGPR としての働きはなく、幼根伸長は細菌無処理区と同程度となった。エチレンは、種子の休眠打破を刺激するのに必要ではあるが、その後の生育には、抑制的に作用するという報告があり、このことを利用して、PHARIS et al. は、エチレン合成阻害剤 aminoethoxyvinyl-glycine をナタネ種子に処理して、発芽後の生育を促進させた。

さらに、この野生株 GR12-2 の特徴としては、低温条件下の土壤中でも耐久性を有し増殖可能なことである (SUN et al., Part 2 : 153)。5°C の低温条件下で培養すると、不凍性タンパク質 (antifreeze protein (s) : AFP) を生合成し培地中に分泌する。その結果、土壤中での PGPR の耐久生存性とナタネ苗根の伸長を促進した。このことから、寒冷地においてもナタネ苗根の伸長促進を可能にさせる特異的な PGPR であることが判明した。

III 根圏での生態と定着性

HAHN et al. (Part 3 : 163) は、土壌からの直接検出法として、オリゴヌクレオチドプローブを作成した後、PCR (polymerase chain reaction) によって標的遺伝子を増幅する方法について総説している。また、HARTMANN et al. (Part 3 : 185) は、*Azospirillum* 属について、種レベルの違いはオリゴヌクレオチドプローブ法を用い、*A. brasilens* の菌株レベルでの選択検出にはモノクローナル抗体を利用して、コムギ根の表面には *A. brasilens* Sp7 が、根の組織内部には Sp245 株が遍在することを明

らかにした。

NAYUDU et al. (Part 3 : 181) は、コムギ立枯病の生物防除資材として有効な *Pseudomonas* sp. AN5 の各種植物根面定着能を調べるため、luciferase 遺伝子 (*lux*) を持つトランスポゾン Tn4431 を AN5 株に導入して生物発光を有する AN5 *lux* 株 (AN5 : Tn4431) を作出した。その結果、供試したすべてのコムギ品種によく定着し、広く他の作物根にもその定着能が確認された。意外なことに、コムギとは分類上遠縁なモクマオウ属 (*Casuarina*) や、アボガド属 (*Persea*) にも強い根面定着性が認められた。

LIU et al. (Part 3 : 210) は、*P. putida* 89B-27 と *E. coli* DH5a (pUCD623) を接合させ、生物発光能を付与した *P. putida* L211 を作出し、キュウリの種子、根、茎、根圏での定着性を 4 週間にわたって経時的に調べた。L211 株は、キュウリの根圏よりも根面と、根組織内により多数定着した。しかし、根から茎へは移動していなかった。長期間追跡調査する場合、これまでの Rifampicin 耐性菌では、根組織内に定着している間に、耐性を喪失して、再分離が困難になることから、このような、生物発光標識システムは、根圏や根組織において、細菌を正確に検出するのに有効な手法となる。

CHEN et al. (Part 3 : 191) は、健全なスイートコーンとワタの植物組織内からのみ分離されたエンドファイト (endophytic bacteria) の、作物生育や生物防除に果たす役割を検討した。特に、ワタから、22 属 170 菌株のエンドファイトを分離し、*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* に起因するワタ萎ちょう病との関係を調べた。感受性品種の茎にエンドファイトを注入して選抜を繰り返したところ、8 菌株で顕著な発病抑制効果と、生育促進効果が確認され、ワタ茎中での増殖も確認された。

IV PGPR の機能増進

PGPR の根への定着性は、宿主植物からの分泌物をどれだけ活用できるかによって左右されると考えられるが、それを証明する明確な報告が少ない。そこで、FARRAND et al. (Part 4 : 233) は、*Agrobacterium tumefaciens* が、宿主植物に感染して、他の根圏微生物にはほとんど利用できないオパイン (opine) を産生させ、それを炭素源や、エネルギーとして利用し定着性を増強させていることにヒントを得て、オパインを産生する形質転換タバコを作出し、根面定着性に優れた *P. fluorescens* にオパイン利用能を付与させた突然変異株 *P. f.-AGR* と、葉面定着性に優れた *P. syringae* pv. *syringae* にオパイン利用能を付与させた突然変異株 Cit7 (pYDH208) を

作出し、相互の関係を検討した。その結果、形質転換タバコへの根面定着性は、*P. f.*-AGR 株の単独接種と、オパイン非利用株 (*P. f.*-Km) 単独接種では有意な差異は認められなかったが、両菌株を混合接種したところ、*P. f.*-AGR 株が定着性に優れていた。一方、葉面定着性では Cit7 (pYDH208) 株のほうが、オパイン非利用株 (Cit: *xylE*) より大量に定着し、両菌株の混合接種でも同様の結果を得た。このことから、作物根面や葉面で生産、分泌される栄養物に競合が生じたとき、その物質に対して異化作用をもつ微生物がその場で優位になることが証明された。

MAHAFFEE et al. (Part 4: 245) は、トウモロコシ穿孔害虫の生物防除に CryIIA δ -endotoxin を持つエンドファイト、*Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* が利用されていたが、殺虫効果があっても収量は減収した。その原因は、*C. xyli* subsp. *cynodontis* の持つ病原性にあるとして、ワタやトウモロコシの茎から分離した非病原性エンドファイト、*B. cereus* に、CryIIA δ -endotoxin をコードするオペロンを持つプラスミド、pMAU-1 をエレクトロポレーション法により導入して形質転換させた。その結果、4 菌株に CryIIA δ -endotoxin が発現され、その LC₅₀'S (半数致死濃度) は、22.2~47.5 μ g/g $\cdot$ diet であった。

V 微生物農薬

OKON et al. (Part 5: 274) は、1974~1994 年にかけて、主として *Azospirillum brasilense* と *A. lipoferum* を用いて、土壌条件や気象条件の異なる 12 か国で、コムギ、トウモロコシ、ソルガムなど農業上重要な 16 品目の作物に対する生長促進効果を検討してきた。その結果、一貫して安定した増収効果を発揮した成功例 (イスラエルでのソルガムに対する効果、フランスでのトウモロコシに対する効果など) から、効果のなかった試験例まで総合すると、60~70%の成功率で、5~30%の増収が得られたと評価し、農業上利用価値があるとしている。今回得られた増収効果は、*Azospirillum* 属細菌の持つ窒素固定能には依存せず、むしろ本菌が根の生理活性、すなわ

ち、根毛や側根の伸長を刺激したり、水分や無機物の吸収を刺激し、indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, TCA 回路、解糖経路の活性に関与する膜の活性を刺激するなど、植物の初期生育に重要な影響を及ぼしたためと結論している。

MOHAMMADI (Part 5: 282) は、*Streptomyces* sp. を主とする微生物農薬、Mycostop を製品化し、主として温室栽培の鑑賞植物や野菜のフザリウム病防除に施用してきた。1990~1994 年までに、フィンランドを初め、10 か国で粉剤、水和剤として栽培者に利用されている。

おわりに

PGPR である蛍光性 pseudomonads では、その研究成果が年々蓄積され、種レベル、菌株レベルでの遺伝子の相同性が検討されるなか、新しい作用機構がみつけれようとしている。それに伴い、標的微生物の土壌生態系における動態を明らかにするための土壌中からの特異的かつ高感度な検出技術も、分子生物学的手法により進歩してきた。組換え微生物の利用を目指した研究が増加する中、一方では PGPR 野生株の分離と選抜を、より多くの作物と広範囲の地域で繰り返す行い、安定的な成果を得る研究も行われてきた。そんな中で、エンドファイトや、耐寒性微生物の役割も注目され、まだまだ、PGPR のもつ機能には知り尽くせぬものがある。次の第 4 回 PGPR ワークショップが、1997 年に北海道で開催されることが決定し、3 年後の開催に向けてその準備が既に始まっている。日本はもとより、アジア諸国からの研究発表が、より一層期待されている。

引用文献

- 1) DÉFAGO, G. and D. HAAS (1990): Soil Biochemistry Vol. 6. Marcel Dekker, Inc., New York, 249~291.
- 2) LAVILLE, J. et al. (1992): Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 1562~1566.
- 3) RYDER, M. H. et al. Eds. (1994): Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria, CSIRO Division of Soils, South Australia, 288pp.
- 4) VAN PEER, R. et al. (1991): Phytopathology 81: 728~734.
- 5) WEI, G. et al. (1991): ibid. 81: 1508~1512.