

植物細菌病防除における バクテリオファージ利用の可能性

中央農業総合研究センター ^{いの}井 ^{うえ}上 ^{やす}康 ^{ひろ}宏

はじめに

バクテリオファージ（単にファージと表記する場合が多い）が最初に論文に登場してから90年が経つ。ファージは細菌に寄生して増殖するウイルスであり、ファージが寄生した細菌は溶菌（殺菌）されるために、その発見後、早くからファージを用いて農作物の細菌病害を防除しようという試みは行われてきた。しかしながら実際に論文などで「ファージを用いた〇〇病の防除」を謳っているものは意外に少なく、ファージの特性などに関する記述にとどまっているものが大部分である。これはファージを用いた防除がいかに難しく、成果を上げ難いものだったかを示している。そのため、抗生物質の発見と合成技術の発達によりファージ防除の研究は一時期影を潜めたが、近年の抗生物質耐性菌の問題や食の安全性に対する意識の高まりなどから再び注目を集めだし、多くの研究が行われるようになった（GOODRIDGE, 2004）。そして、それらの研究の中にはファージ防除を成功させるための重要な成果も含まれている。

ファージを利用した農作物の防除が上手いかわからない理由は、OKABE and GOTO (1963) や VIDAVER (1976) によって述べられているが、それらによると、

- ①ファージの残効性：ファージを葉面や土壌、水等に施用しても、紫外線やその他環境要因によりファージが容易に不活性化するため、効果が得られない
- ②細菌のファージ耐性化：細菌は容易にファージ耐性化し、ファージによる殺菌効果が得られなくなる
- ③細菌のファージ感染型分化：細菌にはファージ感染型が存在するため、同じ種の細菌であってもファージとの組み合わせによって感染の可否が異なる。このため1種類の有用なファージを用いて防除を試みても、そのファージには感染されない菌が存在すると殺菌効果が得られない

の三つが重要な要因として挙げられる。これら問題を解決するためにこれまで様々な研究が行われてきた。

本稿ではファージを利用した植物細菌病害の防除法開

発に関して、その問題点と解決策として研究されている手法について紹介し、ファージ防除の可能性について考察する。

I イネ苗立枯細菌病に対する防除

ファージは紫外線や温度、pH等の要因によって容易に活性を失うが、これら条件を上手くコントロールできればその活性を維持することや、効果的に殺菌することができる。

イネ苗立枯細菌病は種子伝染性の病害であり、その原因細菌である *Burkholderia plantarii* に汚染された種子が混入した場合、浸種・催芽時に病原細菌が増殖し、播種時には苗箱全体で感染が起こって立枯症状を引き起こす。そのため本病の防除には、銅剤やオキシソリニック酸水和剤などの薬液に種子を浸漬処理することで病原細菌の増殖を抑える方法が取られている。この薬剤の代わりに病原細菌を溶菌するファージを入れることで、同様な効果が得られ本病の発病が抑えられる（安達ら, 2003）。ファージの場合、遮光さえすれば一般的な浸種の条件で高い効果が得られることから、種子にダメージを与えることなく防除が行える。また、極端なpHや温度でなければ他の薬剤や処理とも併用が可能である。ファージを用いた本病の防除では、加えるファージ濃度を高くすることで病原細菌のファージ耐性化を防ぐことが重要なボ

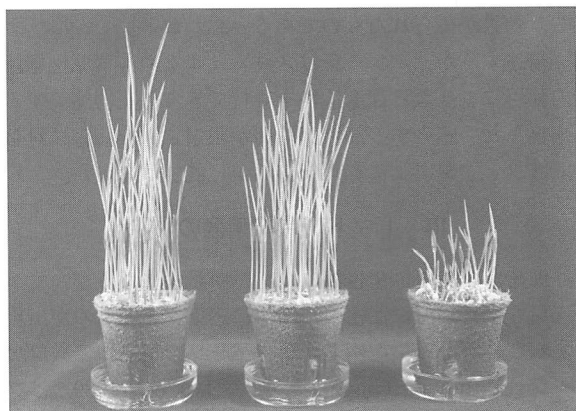


図-1 イネ苗立枯細菌病の防除例

左から無処理苗, 病原細菌およびファージ施用苗, 病原菌施用苗。

Possibility for Control of Bacterial Plant Diseases by Bacteriophages. By Yasuhiro INOUE
(キーワード: バクテリオファージ, 生物防除)

イントとなる(安達ら, 2004)。また、ファージ感染型の分化を調査し、日本国内すべての本病原細菌を溶菌できるファージのセットを用意する必要がある(図-1)。

イネ苗立枯細菌病で用いた手法は、同様に種子伝染性病害であるイネもみ枯細菌病やイネ褐条病においても利用可能と考えられ、これら病原細菌に感染・溶菌させるファージを収集し、得られたファージを混合して用いることでこれら病害を総合的に防除できると考えている。また種子伝染性の細菌病害に限らず、接木時などの特殊な条件下で伝播する病害ではファージによる有効な防除が可能ではないかと思われる。

II イネ内穎褐変病に対する防除

ファージは前章までに述べたとおり、大量に施用しても環境要因により急速にその活性が失われるが、短時間であればその限りではなく、施用する時期を限定することで防除効果を発揮することがある。

イネ内穎褐変病はその原因細菌である *Erwinia ananas* (*Pantoea ananatis*) が開花直後の葯に感染して急激に増殖し、続いて内穎内部の子房基部などで増殖することによって引き起こされる(長谷川, 2007)。また本病原細菌は花粉でも増殖することから、これら感染した花粉の飛散によってさらに周辺の籾への感染が広がると考えられている。本病の発生を抑えるためには開花直後の病原細菌の増殖を抑えることが重要であるが、効果的な防除法はあまり検討されていない。そこで畔上ら(2005)は、開花直後のイネに病原細菌を溶菌するファージを噴霧することで本病の発病を抑制することを明らかにした。これは本病原細菌が葯に感染する段階でファージに溶菌されたためと考えられるが、イネの開花時間は2~3時間と短時間であるためファージの活性が残存し、効果が得られたものであると思われる。

後述するが、ファージはスキムミルクや非病原性細菌の利用により数日程度活性を維持できる。花器感染する病害など、感染する部位と期間が限定された病害に対してはファージによる有効な防除が可能ではないか。

III トマト斑点細菌病の防除

細菌は変異により容易にファージ耐性になるが、ファージも変異し、耐性化した細菌に感染できるものが出現することがある。このようなファージを宿主域変異ファージ(h-mutant phage)という。JACKSON(1989)はファージとそれ由来のh-mutantを作製してあらかじめ混ぜることでファージ耐性菌の出現を抑える手法を考案し、US特許を得ている。この手法を用い、トマト斑点

細菌病などで防除法の開発が試みられている。

トマト斑点細菌病は *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* によって引き起こされる病害であり、前章までに述べた2病害とは異なって、栽培期間を通して感染・発病の可能性があり、予防的に銅剤などの薬剤を定期的に散布することで防除されている。FLAHERTY et al. (2000)は、本病原細菌を溶菌するファージとそれ由来のh-mutantを混ぜてトマト葉に施用することで本病が防除できることを示した。また、BALOGH et al. (2003)はファージの施用時間と防除効果の関係を検討し、夕方に散布するほうが朝よりも効果が高いことを示している。この理由は、朝の散布では日光によってファージが不活性化し、夜間の感染を防ぐことができないが、夕方に散布時間を変更することで日光による不活性化が抑えられ、夜間の感染を防ぐことができるためである。彼らは同時に、スキムミルクやカセクリートを混用すると、これらがファージの保護剤となってファージの残効性が向上することを示しており、IRIARTE et al. (2007)はトマト葉上でのファージの活性低下とUVの関係、スキムミルクなどのファージ保護剤としての役割について詳細に報告している。

本手法を用いた防除法の検討では、その他にゼラニウム斑葉細菌病、ポインセチア軟腐病、Walnut blightなどでも検討されており、今後の研究の進展が期待される。

IV タバコ立枯病の防除

タバコ立枯病、トマト青枯病の病原細菌である *Ralstonia solanacearum* は培養中に病原性を失った菌株を生じるが、病原性を失った菌株の培地上での集落の形態は病原性を有するものと容易に識別でき、簡単に分離できる。TANAKA et al. (1990)は病原性を喪失した *R. solanacearum* をタバコの根に処理することでタバコ立枯病の発病を低減できることを示したが、その際にファージを加えることで発病抑制効果が上がることを報告している。同時に彼らは、ファージ感染型が異なる立枯病菌の存在下では、ファージによる発病抑制効果は全く認められないことも示している。

TANAKA et al. の手法を実用化するためにはファージ感染型の分化を正確に把握して必要なファージをすべてそろえることと、病原性が復帰しない形質の安定した病原性喪失株を得ることが必要である。永田ら(2005)は防除利用を目的として *R. solanacearum* に感染するファージの収集と類別を行っており、今後の研究の進展が期待される。また、本病原細菌では病原性遺伝子に関する研究も進んでおり、病原性の復帰しない安定した非病原性

細菌の分離・作出も可能と考えられる。

V キャベツ黒腐病の防除

一般にファージの寄主範囲は狭いと思われがちであるが、必ずしもそうではなく、下水や土壌から分離されるファージには宿主域が広いものが多いようである（後藤，1990）。また，病原細菌と近縁であるが病原性をもたない細菌も自然界には存在しており，これらを利用した防除法の開発が試みられている（図-2）。

畔上と小原（2003）はヌカキビからイネやキャベツに病原性をもたない *X. campestris* を分離し，この非病原性細菌とイネ白葉枯病菌（*X. oryzae* pv. *oryzae*）を同時に溶菌するファージを見つけ，これらを混ぜてイネに施用するとイネ白葉枯病の発病を抑制できることを温室内試験で明らかにした。このファージはキャベツ黒腐病菌（*X. c.* pv. *campestris*）をも溶菌することがわかり，これらを用いてキャベツ黒腐病の防除試験を行った結果，圃場においても防除効果があることが示された（畔上ら，2006）。現在，防除利用を目的として *X. c.* pv. *campestris* に感染するファージの収集，ファージ感染型の調査と地域的分布の調査が行われており（井上，2007），今後の研究の進展が期待される。

VI その他のファージ防除に関する研究

アメリカにおいて，リンゴ火傷病に対するファージ防除が検討されているようである。GILL et al. (2003) は，収集したリンゴ火傷病菌とそのファージのグルーピングを行っている。また，直接ファージを利用するものではないが，SALM and GEIDER (2004) はファージの生産する溶菌酵素の利用を目指し，その特異性について調査を行っている。

INOUE et al. (2006) はイネ白葉枯病菌ファージにおいて h-mutant の出現様態を明らかにした。また，INOUE et al. (2007) は細菌のファージ吸着に関係する遺伝子を明らかにし，その遺伝子の塩基配列の違いによってファージ感染型が分けられ，PCR により簡便にファージ感染型が分けられることを示した（井上ら，2007）。このような成果は，圃場におけるファージ感染型分布の迅速・簡便な調査方法の開発やファージの宿主域改変手法の開発に寄与するものと考えられる。



図-2 キャベツ黒腐病の防除例
左：ファージ防除区，右：無防除区。

おわりに

前章までに述べてきたように，研究の段階では防除手法として期待できる成果が出てきており，ファージによる防除が成功する可能性は高まっている。しかし，これらを実用化させるためにはまだ多くの問題が残されている。その中には他の微生物を用いた生物防除と同様，農薬登録や経済性の問題が含まれており，これらの解決策は今後重要な検討課題である。

引用文献

- 1) 安達直人ら (2003) : 日植病報 69 : 286.
- 2) ————ら (2004) : 同上 70 : 67.
- 3) 畔上耕児・小原達二 (2003) : 日植病報 69 : 45.
- 4) ————ら (2005) : 同上 71 : 43.
- 5) ————ら (2006) : 同上 71 : 43.
- 6) BALOGH, B. et al. (2003) : Plant Dis. 87 : 949 ~ 954.
- 7) FLAHERTY, J. E. et al. (2000) : HortScience 35 : 882 ~ 884.
- 8) GILL, J. J. et al. (2003) : Appl. Environ. Microbiol. 69 : 2133 ~ 2138.
- 9) GOODRIDGE, L. (2004) : TRENDS Microbiol. 22 : 384 ~ 385.
- 10) 後藤正夫 (1990) : 植物細菌病理学概論，養賢堂，東京，283 pp.
- 11) 長谷川優 (2007) : 植物細菌病談話会論文集 24 : 31 ~ 39.
- 12) INOUE, Y. et al. (2006) : J. Gen. Plant Pathol. 72 : 111 ~ 118.
- 13) ———— et al. (2007) : ibid. 73 : 365 ~ 369.
- 14) 井上康宏 (2007) : 植物細菌病談話会論文集 24 : 40 ~ 47.
- 15) ————ら (2007) : 日植病報 73 : 269.
- 16) IRIARTE, F. B. et al. (2007) : Appl. Environ. Microbiol. 73 : 1704 ~ 1711.
- 17) JACKSON, L. E. (1989) : U.S. Patent No. 4, 828, 999.
- 18) 永田祥子ら (2005) : 日植病報 71 : 303.
- 19) OKABE, N. and M. GOTO (1963) : Annu. Rev. Phytopathol. 1 : 397 ~ 418.
- 20) SALM, H. and K. GEIDER (2004) : Phytopathol. 94 : 1315 ~ 1322.
- 21) TANAKA, H. et al. (1990) : 日植病報 56 : 243 ~ 246.
- 22) VIDAVER, A. K. (1976) : Annu. Rev. Phytopathol. 14 : 451 ~ 465.