

日本産の抵抗性誘導微生物 *Pythium oligandrum* 菌株 研究の現状

(独)農業・食品産業技術総合研究機構本部*

東北大学大学院農学研究科・農学部

たけ
竹
たか
高
なか
中
はし
橋
しげ
重
ひで
英
ひと
仁
き
樹

はじめに

非病原菌であるが作物根圏定着性の *Pythium oligandrum* (PO) は、植物病原菌を含む多くの糸状菌に寄生する能力を有することから、海外では35年以上も前から土壌病害の生物防除微生物として注目されてきた。POは「寄生」以外に「抗生」や「競合」といった病原菌に直接的な影響を与える能力と、「抵抗性誘導」のような作物の防御システムを介して間接的に病原菌に影響を与える能力を有している (REY et al., 2008)。特に、「抵抗性誘導」は、本来植物が持っている防御システムを利用することから「抗生」に比べて安全であり、「寄生」や「抗生」より広範な病原体に有効で、「競合」より少ない菌量で効果が期待できる。そこで、我々は我が国土着の抵抗性誘導能力のある PO 菌株を用いて、抵抗性誘導機構を解明するとともに、病害防除に応用可能な技術開発を目指してきた。今までに得られた成果と今後の研究の方向性について述べてみたい。

I POによる抵抗性誘導機構の解明

1 PO定着による植物体の防御応答

我々は、POによる作物への抵抗性誘導機構を解明するため、根部にPOを接種したトマト組織中でのPOの動態およびPOと青枯病菌との相互関係を詳細に観察した (TAKENAKA et al., 2008; MASUNAKA et al., 2009)。POは根部の表皮細胞に定着し、菌糸の一部を表皮細胞内に侵入させるが、その後は病原菌のように細胞間隙や細胞内をまん延しない。そして、POを前接種した根部に青枯病菌を有傷接種すると、PO無接種区に比べて主根、側根における青枯病菌のまん延が顕著に抑制される。特に、POが定着していない側根や主根の有傷部でも青枯病菌の侵入・まん延が抑制されることから、POが直接

的に青枯病菌の感染を抑制するのではなく、PO定着によりトマトに抵抗性が誘導され、その防御システムを介して青枯病菌の侵入・まん延が抑制されることが示唆された。

POが植物の根圏に定着することにより植物のどのような防御システムが誘導されるかについては、PO卵胞子あるいは後述するPOのエリシター物質である細胞壁タンパク質画分(CWP)を処理したトマトを用いたcDNAアレイ解析、防御関連遺伝子の発現解析およびシグナル伝達変異体解析により明らかにした (HONDO et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2006; HASE et al., 2006; 2008; KAWAMURA et al., 2009 a)。PO卵胞子あるいはCWPをトマトの根に処理すると、①ファイトアレキシン合成などの2次代謝にかかわる遺伝子、ジャスモン酸(JA)やエチレン(ET)を介したシグナル伝達系に関与する遺伝子、ユビキチンプロテアソーム、糖代謝やアミノ酸代謝にかかわる遺伝子の発現が蒸留水(DW)処理区に比べて3倍以上上昇する、②ET生成量がDW区に比べて一過的に増加するとともに、ETのレセプターホモログ(*ETR4*)、ET応答性の転写因子(*ERF2*)およびET誘導性の*LeCAS*やPRタンパク質遺伝子(*PR-2b*, *PR-3b*, *PR-5b*)の発現が上昇する、③サリチル酸(SA)生成量の有意な増加やSA誘導性のPRタンパク質遺伝子(*PR-2a*)の発現上昇は認められない、④JA誘導性の*LeATL6*やPRタンパク質遺伝子(*PR-6*)の発現が上昇し、青枯病菌を後接種するとPO無接種区に比べて有意な発病抑制効果が認められる、⑤一方、CWPあるいはPO卵胞子をJA非感受性変異トマト*jai1-1*に処理すると、*LeATL6*や*PR-6*の発現が誘導されず、青枯病の有意な発病抑制効果も認められなくなる。以上の結果から、POによるトマトでの抵抗性誘導には主にETおよびJAを介したシグナル伝達系の活性化が関与していることが判明した。

上記のPOにより誘導される遺伝子のうち、ET誘導性の*LeCAS* (TAKAHASHI et al., 2006; 2010) およびJA誘導性の*LeATL6* (HONDO et al., 2006) に関しては、さらに詳細な機能解析を実施した。*LeCAS*は、ETがアミノプロパンカルボン酸(ACC)から合成される過程で発生

Present Status of Studies on a Resistance-inducing Beneficial Microbe, *Pythium oligandrum* in Japan. By Shigehito TAKENAKA and Hideki TAKAHASHI

(キーワード: 生物防除, 微生物資材, 病害防除, *Pythium oligandrum*)

* 現所属: 農林水産省農林水産技術会議事務局

する毒物のシアンをシステインと反応させて無毒のシアノアラニンに変換するシアノアラニン合成酵素の遺伝子であり、プロベナゾールなどの Plant activator などによっても安定的に発現が誘導される。しかし、乾燥、塩害、熱処理等の非生物的な環境ストレスでは誘導されない。一方、*LeATL6* は 1 次構造解析および遺伝子産物の酵素活性試験から、RING-H2 finger 型 E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子であり、本酵素は標的タンパク質の C 末にユビキチンを付加させ、26S プロテアソーム系により分解させる機能を有する。野生トマトの細胞内で *LeATL6* を過剰発現させると JA 誘導性の *PR-6* の発現が誘導されるが、JA シグナル伝達系変異体 *jai1-1* では *PR-6* の発現が誘導されないことから、PO により *LeATL6* → *JAI1-1* → *PR-6* の JA シグナルカスケードが活性化されることが明らかになった。酵母ツーハイブリッドシステムにより、この *LeATL6* と相互作用するタンパク質をスクリーニングしたところ、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (SAMDC) が単離された。SAMDC は ET の前駆体でもある S-アデノシルメチオニン (SAM) を ET 合成ではなくスペルミンやスペルミジン合成の代謝経路に導く酵素であることから、*LeATL6* が SAMDC の分解に関与することにより ET の生成量を間接的に増加させるものと推察される。

また、トマト以外の植物として、CWP 処理によるテンサイの防御応答の解析も行った (TAKENAKA et al., 2003; 2006; TAKENAKA and TAMAGAKE, 2009)。CWP をテンサイの根部および葉身部に処理すると、① Respiratory burst oxidase, Oxylate oxidase-like germin といった活性酸素の生成に関連する酵素の遺伝子発現が上昇し、一時的に活性酸素が生成される。一方、活性酸素は病原菌に対する殺菌効果、病原菌の侵入を阻止するために自分の細胞壁を肥厚させる効果等があるが、植物体自体にも悪影響を与えるため、Glutathione S-transferase といった解毒酵素の遺伝子も誘導される。さらに、外敵の侵入などの情報伝達に関係している Receptor-like serine/threonine kinase の遺伝子や、脂質合成に関与する遺伝子、および病原菌の溶菌酵素の一つである β -1,3 glucanase の遺伝子も誘導される。

さらに、シロイヌナズナ変異体を用いて CWP 処理による詳細な防御応答解析も実施した (KAWAMURA et al., 2009 b)。シロイヌナズナでも CWP 処理により、JA 誘導性の PR タンパク質遺伝子 (*PDF1.2*, *JR2*) の発現が誘導される。また、シグナル伝達系に異常をきたした 13 種類の変異体を用いた遺伝子発現解析や青枯病菌と *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 を用いたバイオ

アッセイから、NB (nucleotide-binding)-LRR (leucine-rich repeat) ドメインをもつ抵抗性タンパク質による病害抵抗性に関与する SGT1 遺伝子と RAR1 遺伝子、および全身誘導抵抗性や根圏細菌による誘導抵抗性の発現に関与する NPR1 遺伝子が、CWP による誘導抵抗性にも必要であることが明らかとなった。

2 PO の抵抗性誘導物質

PO の抵抗性誘導物質として、PICARD et al. (2000) は、PO の培養液からアミノ酸配列中にエリシチンと類似した配列 (エリシチンドメイン) を有している分子量約 10 kDa のエリシタータンパク質を分離し、*oligandrin* と命名した。エリシチンとは、*Phytophthora* 属菌や *Pythium* 属菌が産生し、タバコなどのごく一部の植物種に過敏反応を引き起こす低分子量の細胞外タンパク質エリシターの総称である (PONCHET et al., 1999)。一方、我々も *oligandrin* とは別のエリシタータンパク質を PO の細胞壁面分から見だし、CWP と命名した (TAKENAKA et al., 2003; 2006)。この CWP は、2 種の主要なタンパク質 POD-1 と POD-2 からなり、両者はアミノ酸レベルで約 83% の相同性があり、両者とも重量比で約 15% の糖を含んだ糖タンパク質である。POD-1 が 151 のアミノ酸残基、POD-2 が 145 のアミノ酸残基からなり、両者とも 2 番目のスレオニンから 92 番目のイソロイシン (I) までエリシチンドメインを、残り C 末までは O-グリコシド型の糖鎖結合ドメインを形成している (図-1 A)。JIANG et al. (2006) は、今まで報告されている 156 種のエリシチンのエリシチンドメインの系統樹解析を実施し、17 のクレードに分けている。POD-1 と POD-2 のエリシチンドメインを各クレードの代表的なエリシチンと系統樹解析を行った結果、両タンパク質は *oligandrin* 以外の既往のエリシチンとは類似度が低く、新しいタイプのエリシチン様タンパク質であることが明らかとなった (MASUNAKA et al., 2010)。POD-1 と POD-2 はエリシチンドメイン内に六つのシステインを持っており、これらは分子内で S-S 結合を形成しているのに対し、C 末にも一つのシステインがある。POD-1 と POD-2 の高次構造予測や電気泳動解析から、POD-1 と POD-2 は図-1 B のようなエリシチンドメインが球状で細胞表面に出ており、O-グリコシド型の糖鎖結合ドメインが棒状で細胞壁に突き刺さっている「棒付きキャンディー」のような構造をして、C 末のシステインが S-S 結合を形成して二量体化すると推察されている (TAKENAKA et al., 2011)。また、ゲルろ過や質量分析により、POD-1 と POD-2 は CWP 中で図-1 C のようなヘテロ 6 量体 (一部は POD-1 のホモ 6 量体) を形成し、これら複合体にトマトへの

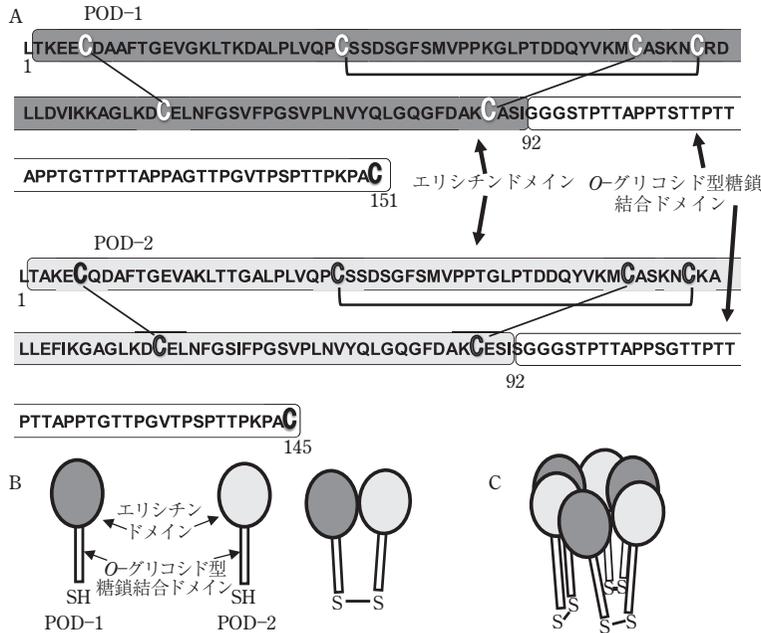


図-1 POD-1とPOD-2の1次構造(A)および予測される3次構造(B)と重合体の模式図(C)

抵抗性誘導活性が認められる。これらを DTT などの還元剤で処理すると抵抗性誘導活性が失活することから、これら6量体に共通した高次構造(おそらくリング構造)をトマトが認識することにより、抵抗性が誘導されるものと考えられる。

3 POによるトマトでの抵抗性誘導の分子機構

今まで得られた結果および仮説をもとに、POによるトマトでの抵抗性誘導の分子機構を、図-2のようにまとめてみた。POがトマトの根部に定着すると、POの細胞壁に存在するPOD-1とPOD-2という2種のエリシチン様タンパク質の複合体(POD-1とPOD-2のヘテロ6量体あるいはPOD-1のホモ6量体)の共通した高次構造を、トマトの細胞膜などに存在するレセプター(LRRレセプター型タンパク質?)が「非自己」として認識すると、JAとETを介したトマトのシグナル伝達系が活性化される。JAシグナル伝達系では、JA生成後に*LeATL6*が活性化され、SAMDCが分解されることにより、ET合成が間接的に促進されてETシグナル伝達系が活性化される。また、*LeATL6*の発現が下流の*JAI1-1*を経由して*PR-6*などの防御遺伝子の発現を誘導させる。一方、ETシグナル伝達系では、ET生成後に*LeETR4*→*LeERF2*の順で発現が誘導され、*PR-2b*などの防御遺伝子が最終的に活性化される。ただし、ET合

成の過程で発生するシアンを解毒するため、*LeCAS*が一過的に発現上昇して無毒のシアノアラニンが生成される。最近の研究から、このシアノアラニンはJAシグナル伝達系を活性化させ*PR-6*の発現を誘導させることが明らかになってきた(長谷ら、投稿審査中)。このように、POのトマト根部定着により、JAとETのシグナル伝達系が協調的なクロストークにより相互に活性化され、病原菌の感染を抑制しているものと考えられる。

II POによる病害防除効果

上記のような抵抗性誘導能力を有するPOを実際の病害防除の場面で利用する場合、POの菌体あるいはPOを製剤化して接種する方法と、POの産生する抵抗性誘導物質を施用する方法が考えられる。前者の方法としては、POが形成する器官(菌糸、卵胞子、遊走子、遊走子のう等)の中から、大量培養時に容易に形成され、しかも生存能力の高い卵胞子を選択した。また、ホクサン(株)を中心にPOの製剤化に取り組み、卵胞子懸濁液にPOの生育を促進する成分として炭酸カルシウムを、製剤としての物性を高めるためにPOの生育に影響を与えない界面活性剤を、各々加えて卵胞子製剤を開発した。一方、抵抗性誘導物質としては、PO培養菌体1g(湿重)から平均で2.7mgもの抽出が可能なCWPを用いた。

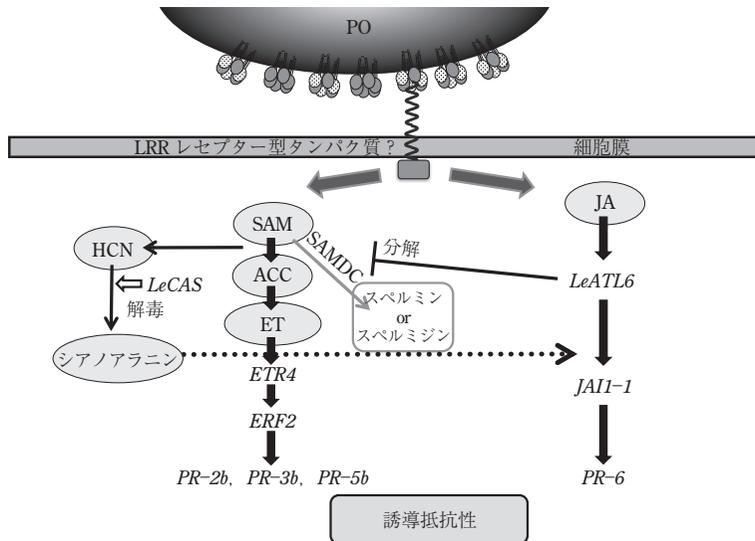


図-2 *Pythium oligandrum* (PO) によるトマトでの抵抗性誘導の分子機構 (仮説も含む)

1 PO の卵胞子処理

PO の卵胞子懸濁液あるいは卵胞子製剤を用いて、トマト青枯病に対する防除効果を調査した (松田ら, 2010 a)。卵胞子製剤 (卵胞子数 5×10^6 個/株) を①トマト接ぎ木苗の鉢上げ時のみ、②鉢上げ時と定植 1 週間前の 2 回、③鉢上げ時と定植 1 週間前と定植 2 週間後の 3 回処理して、青枯病菌を土壤接種した甚発生条件下 (無処理区の発病度 80) のハウスで試験を実施した。その結果、1 回と 2 回処理区では定植 21 ~ 28 日以降に発病が急激に上昇し無処理区との発病程度に有意差が認められなくなったが、3 回処理区では定植 70 日経過しても無処理区と有意差が認められた (口絵①)。また、現地圃場でも検定を行い、無処理区の発病度が 11 程度の条件では、鉢上げ時 1 回処理で十分な防除効果が得られた (表-1) (前田・竹中, 未発表)。

ジャガイモ黒あざ病に対する PO の防除効果についても、卵胞子懸濁液を用いて検定した (口絵②; 池田ら, 2007; IKEDA et al., 2012)。黒あざ病は種いも伝染することから、通常は種いもを薬剤に浸漬処理して風乾後に浴光催芽させて圃場に植え付ける、種いも消毒が実施されている。この種いも消毒を PO 処理に適用し、罹病種いもを卵胞子懸濁液 (10^4 個/ml) に浸漬処理すると、発病指数が 84.0 の無処理区に比べて発病指数が 50.6 と明らかな防除効果が認められ、発病指数が 36.5 のフルトラニル水和剤処理区とほぼ同等の発病抑制効果であった。また、本病は土壤伝染もすることから、健全いもを

表-1 PO 卵胞子製剤によるトマト青枯病の発病抑制効果 (前田・竹中, 未発表)

処理区 a)	定植 63 日後		
	発病度 b)	発病株率	防除係
鉢上げ時のみ	3.41	4.55	68.4
無処理	10.79	10.6	

a) 各処理区は 1 区 16 株, 11 反復。

b) 発病度は \sum 発病度別株数 \times 発病指数 / (4 \times 発病調査数 \times 100)。発病指数は 0 (外部病徴なし) ~ 4 (枯死) の 5 段階評価。

上記の卵胞子懸濁液に浸漬して汚染土に植え付けた結果、無処理区のストロン発病度が 73.3 であったのに対し、PO 処理区では 37.8 で薬剤処理区の 57.2 と同等以上の発病抑制効果が認められた。黒あざ病の防除効果は、卵胞子製剤を用いても同様の防除効果が認められたことから、卵胞子製剤はジャガイモ黒あざ病に対する生物農薬として有望であり、ジャガイモの減農薬栽培に組み込むことが可能であると考えられる。さらに、PO による本病抑制機構は、PO の黒あざ病菌への寄生と PO によるジャガイモへの抵抗性誘導が関与していることが判明した (IKEDA et al., 2012)。

さらに、PO 卵胞子懸濁液をテンサイ播種時のペーパーポットの覆土と育苗時 (本圃移植 32 日前) に灌注処理することにより、本圃で発生する黒根病の被害 (無処理区の発病指数 [0 ~ 5 の発病調査基準から算出] 2.62)

を有意に抑制し(発病指数2.00), その抑制程度はフルアジナム処理区(発病指数2.06)と同等レベルであった(TAKENAKA and ISHIKAWA, 印刷中)。

その他, POの卵胞子製剤あるいは卵胞子懸濁液を用いることにより, イネばか苗病(高井ら, 2006), イネいもち病(高井ら, 2006), イネのみ枯細菌病(長谷ら, 投稿審査中), ベニバナインゲン茎根腐病(松田ら, 2010b), ホウレンソウ苗立枯病(松田ら, 2010c)に対して防除効果があることも明らかになっている。

2 CWP処理

抵抗性誘導物質であるPOのCWPを葉面に噴霧処理することにより, テンサイ褐斑病の被害を抑制できるか否かポット試験と圃場試験により検定した(TAKENAKA and TAMAGAKE, 2009)。

ポットで栽培したテンサイ(完全展開葉が10~12枚)に10 μ g/mlあるいは100 μ g/ml濃度のCWP水溶液を葉面散布し(10ml/個体), 24時間後に褐斑病菌の分生子懸濁液(5 \times 10⁴/個体)を噴霧接種して, 接種2週間後に発病指数を調査した。その結果, DW区(発病指数0~5の発病調査基準から算出)が0.98であったのに対し, 10 μ g/mlのCWP散布区で0.48, 100 μ g/mlのCWP散布区で0.47であり, ジフェノコナゾール散布区の発病指数0.21に比べると防除効果は劣ったが, 明らかな発病抑制効果が認められた。

2008年には圃場においてCWPのテンサイ褐斑病の抑制効果を検定した。北海道では通常, 褐斑病を防除するために年に3~4回殺菌剤を散布している。そこで, CWP水溶液(10 μ g/mlを1株当たり10mlずつ)を2回, 3回および4回葉面散布し, 対照の無散布区および薬剤散布区(マンゼブ500倍液2回, ジフェノコナゾール2,500倍液1回散布を1株当たり10mlずつ)と本病の発病指数を比較した。前年の罹病葉を土と混合し圃場に散布したため, 無散布区では成葉のほとんどが発病しえ死も認められるような甚発生であった(発病指数[0~5の発病基準から算出]3.20)。このような状況の中で, CWPの4回散布の発病指数は2.83と薬剤散布(発病指数2.20)に比べて抑制効果がやや劣ったが, 無散布区よりは有意に発病指数を軽減した。

CWPは褐斑病菌以外のテンサイ病害にも効果があり, CWPを根に処理することにより, *Rhizoctonia solani*や*Apahomyces cochlioides*による苗立枯病を抑制する。ま

た, コムギの穎花に処理することにより赤かび病の被害を抑制することも明らかになっている(TAKENAKA et al., 2003; 2006)。

おわりに

生物防除剤として潜在能力の高いPOの卵胞子製剤あるいはPOのCWPは, 残念ながらまだ実用化されていない。その大きな理由の一つが低コストでの卵胞子大量培養法やCWP大量抽出法が確立されていないためである。特に, 低コストな卵胞子の大量培養法に関しては, 他の研究機関との連携も視野に入れ, その実現を目指していきたい。

ここで紹介した研究成果は, 生物系特定産業技術研究支援センターの「異分野融合研究支援事業」などにおいて, 農研機構 増中 章氏, 関口博之氏, 北海道立総合研究機構 池田幸子氏, 清水基滋氏, ホクサン(株) 出崎里永子氏, 半澤 卓氏, アリスタライフサイエンス(株) 松田 明氏, 高井 昭氏, 山中 聡氏, 新潟県農業総合研究所 前田征之氏, 山形大学 長谷 修氏らの協力により得られたものであり, 厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 1) HASE, S. et al. (2006): *Plant Pathol.* **5**: 537 ~ 543.
- 2) ——— et al. (2008): *ibid.* **57**: 870 ~ 876.
- 3) 長谷 修ら: 日植病報(投稿審査中).
- 4) ———ら: 同上(投稿審査中).
- 5) HONDO, D. et al. (2006): *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**: 72 ~ 81.
- 6) 池田幸子ら(2007): 北日本病害虫研報 **58**: 30 ~ 33.
- 7) IKEDA, S. et al. (2012): *Biological Control* **60**: 297 ~ 304.
- 8) JIANG, R. H. Y. et al. (2006): *Mol. Biol. Evol.* **23**: 338 ~ 351.
- 9) KAWAMURA, Y. et al. (2009 a): *J. Phytopathol.* **157**: 287 ~ 297.
- 10) ——— et al. (2009 b): *Plant Cell Physiol.* **50**: 924 ~ 934.
- 11) 松田 明ら(2010 a): 茨城病虫研報 **49**: 46 ~ 53.
- 12) ———ら(2010 b): 同上 **49**: 54 ~ 58.
- 13) ———ら(2010 c): 同上 **49**: 59 ~ 64.
- 14) MASUNAKA, A. et al. (2009): *J. Gen. Plant Pathol.* **75**: 281 ~ 287.
- 15) ——— et al. (2010): *J. Phytopathol.* **158**: 417-426.
- 16) PICARD, K. et al. (2000): *Plant Physiol.* **124**: 379 ~ 395.
- 17) PONCHET, M. et al. (1999): *Cell Mol. Life Sci.* **56**: 1020 ~ 1047.
- 18) REY, P. et al. (2008): *Plant-Microbe Interactions, Research Signpost, Kerala, India*, p. 43 ~ 67.
- 19) 高井 昭ら(2006): 同上 **46**: 15 ~ 18.
- 20) TAKAHASHI, H. et al. (2006): *Phytopathology* **96**: 908 ~ 916.
- 21) ——— et al. (2010): *J. Phytopathol.* **158**: 132 ~ 136.
- 22) TAKENAKA, S. and S. ISHIKAWA. JARQ (印刷中)
- 23) ——— and H. TAMAGAKE (2009): *J. Gen. Plant Pathol.* **75**: 340 ~ 348.
- 24) ——— et al. (2003): *Phytopathology* **93**: 1228 ~ 1232.
- 25) ——— et al. (2006): *Mol. Plant Pathol.* **7**: 325 ~ 339.
- 26) ——— et al. (2008): *Phytopathology* **98**: 187 ~ 195.
- 27) ——— et al. (2011): *J. Plant Physiol.* **168**: 1972 ~ 1979.