

非病原性細菌を用いた適応病害の多い微生物農薬開発の試み

非病原性 *Xanthomonas* 属細菌の特徴と発病抑制機構

農研機構中央農業総合研究センター <sup>いのうえ</sup>井上 <sup>やすひろ</sup>康宏・<sup>なかほ</sup>中保 <sup>かずひろ</sup>一浩  
 静岡大学創造科学技術大学院 <sup>たき</sup>瀧 <sup>かわ</sup>川 <sup>ゆう</sup>雄 <sup>いち</sup>一

## はじめに

細菌による農作物病害の特徴は発生予測が難しく、気象・環境条件が病害菌の増殖に適すると爆発的に増加し、さらにいったん発生すると効果的な防除薬剤がないために深刻な経済的被害をもたらすことである。現在、防除薬剤には予防的に銅剤や抗生物質剤等が使用されているが、抗生物質剤の多用は環境中に薬剤耐性菌を生じさせ、それらが人畜病原菌の薬剤耐性化の一因となる可能性が指摘されている。また銅剤の連用も銅剤耐性菌の出現を促す可能性があるとともに、生産物に汚れなどの被害が生じる場合がある。このため、銅剤や抗生物質剤に代わる新たな薬剤の開発が望まれている。環境保全と食の安全・安心に対する関心が高まる中、微生物農薬の開発が盛んに行われるようになった。

微生物農薬は特定の病原菌にのみ作用して病害の発生を低減させるため、環境に対する負荷が少ないことが利点であるが、対象とする病原菌が限られれば利用場面も限定され、また、使用量が限られればその剤の開発や製造に掛かる費用もすべて販売価格に反映される。このため経済的な優位性の高い作物を対象にした剤しか開発できないのが現状である。この問題点を解決するためには、防除対象となる作物および病害の多い剤を開発する必要がある。

*Xanthomonas* (キサントモナス) 属細菌は多くの病原型：パツパーを持ち、合わせて 100 種類以上もの植物に対して病気を引き起こす。また、それぞれの病原型は感染できる植物が決まっており、その植物にのみ病気を引き起こす。例えばカンキツにかいよう病を引き起こす病原細菌はカンキツに、一方、トマトに斑点細菌病を引き起こす病原細菌はトマトにしか加害しない。これら *Xanthomonas* 属細菌病害による被害を総計すると、日本で年間およそ 130 億円程度の被害があると推察される。

Characterization of Non-Pathogenic *Xanthomonas* spp. and Elucidation of Mechanisms for their Disease-Control Activities.  
 By Yasuhiro INOUE, Kazuhiro NAKAHO and Yuichi TAKIKAWA

(キーワード：微生物農薬, 非病原性, *Xanthomonas* 属細菌, 細菌病害)

*Xanthomonas* 属細菌の中からは、まれに植物に病原性を示さないもの(非病原性細菌)が分離され、この非病原性細菌を植物体に処理すると病原細菌の感染が抑制されることが、これまでに行った我々の一連の研究の中で明らかとなってきた。この非病原性細菌を利用することで多種病原型の *Xanthomonas* 属細菌によって引き起こされる多種病害をまとめて 1 剤で防除できる、すなわち多くの使用が見込まれ、農薬販売の採算が取れるような微生物農薬が開発できる可能性がある。

本ミニ特集では非病原性 *Xanthomonas* 属細菌を用いた適応病害の多い微生物農薬開発の試みについて紹介する。試作製剤を用いた実際の防除効果については各試験担当者に執筆いただき、本稿では非病原性 *Xanthomonas* 属細菌の特徴と発病抑制機構について記載する。なお、本研究は、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の助成を受けて行った。

## I 非病原性細菌の特徴

## 1 分類学的位置付け

非病原性 *Xanthomonas* 属細菌はこれまでに世界中でいくつかの報告があり (VAUTERIN et al., 1996; GONZALEZ et al., 2002), これらを用いた植物病害の防除も報告されている (YUSUF and SALLY, 2004; 井上ら, 2009)。 *Xanthomonas* 属細菌の分類に関して、近年では塩基配列の比較を指標とした類別が行われており、26 の種名が提案されている (BULL et al., 2010)。日本国内で分離された非病原性 *Xanthomonas* 属細菌について DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 (*gyrB*), RNA ポリメラーゼ  $\sigma$  ファクター遺伝子 (*rpoD*) 等の保存性の高い遺伝子の塩基配列比較を用いて調査すると、多くは *X. arboricola* 群あるいは *X. hortrum* 群に属するが、既知のいずれの種にも属さないものも多く存在し、属内の構成は多種多様であることがわかってきた (森本ら, 2013)。我々が微生物農薬の開発に用いている菌株 (11-100-01 株, 11-110-01 株) も、細菌学的性状および 16SrDNA の塩基配列相同性からは広義の *X. campestris* のグループに属するが、上記遺伝子の比較解析結果からは、本細菌が新種である可能性が示された。

## 2 非病原性であることの確認

前述のとおり、*Xanthomonas* 属細菌は植物に病原性を有することが特徴の一つであることから、分離された宿主植物に対するだけでなく、他の植物に対して病原性を持たないことを確認することが重要である。一例として、農研機構中央農業総合研究センターで分離、保存されているイネ科雑草から分離された *Xanthomonas* 属細菌の中には、分離源の植物には病原性がないが、レタスに対しては病原性を示す菌株が存在している。我々が微生物農薬の開発に用いている2菌株については6科25種類の植物に針接種で病原性検定を行っており、いずれの植物にも病原性を示さなかった。また、植物に対する病原性発現に重要な役割を果たすとされるタイプIII分泌機構の制御遺伝子および構造遺伝子の有無について、これら菌株に対して、病原細菌の遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったが、相同領域は見いだせなかった。これらのことからこれら菌株については非病原性であると判断している。日本国内で分離された非病原性 *Xanthomonas* 属細菌について、タイプIII分泌機構の制御遺伝子および構造遺伝子の存在を同様に調査すると、菌株によって両方持つもの、片方のみ持つもの、いずれも存在しないものに分かれ、バリエーションがあることがわかってきている(森本ら, 2013)。

## 3 保存安定性

微生物農薬の開発に用いている菌株は凍結乾燥に弱く、従来の方法では生菌密度を安定させることが難しいことが製品化への障害となっている。一方で細菌懸濁液の4℃での保存安定性は高いことから、製剤の試作においては凍結乾燥による水和剤と、細菌懸濁液による液体製剤を作製している。

## II 非病原性細菌による発病抑制機構

### 1 非病原性細菌の定着部位

非病原性細菌による発病抑制機構を解明する上で、当該非病原性細菌が植物体上の何処に定着して生残するのことは非常に重要な情報である。そこで非病原性細菌およびアブラナ科黒腐病菌の抗生物質耐性菌、発光遺伝子または緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を挿入した組換え体を作製し、アブラナ科植物を用いてその定着部位と菌密度の変化について調査を行った。

キャベツに発光遺伝子組換え体を噴霧接種した場合、非病原性細菌は葉にできた傷口部分に定着して増殖する(口絵①)。発光は接種1日後から1週間程度観察できることから、その期間では増殖していることがわかる。一方、病原細菌においても同様な部位で発光が認められる

(口絵②)ことから、両者間で定着部位の競合が起きているものと考えられる。さらにGFP遺伝子を挿入した組換え体を用いた葉の傷口部分での定着性について比較すると、両者の決定的な違いは、病原細菌が傷口部分から組織内部に侵入するのに対し、非病原性細菌では傷口のわずかな部位にのみ存在することであった(中保ら, 2014)。また、GFP遺伝子組換え非病原性細菌を用いた試験からは、非病原性細菌は接種2週間後でも傷口部分に存在し、傷口以外にも老化した部分に定着していることが明らかとなった。

### 2 非病原性細菌による病原細菌増殖抑制

非病原性細菌と病原性細菌が植物体上の定着部位で競合していることが明らかとなったことから、競合による相互の増殖に対する影響を調査した。非病原性細菌を $10^8$  CFU/mlの濃度で葉の傷部分に噴霧接種し、傷口から5 mmまでの部位の菌密度を測定すると、およそ $10^{5.6}$  CFU/cm<sup>2</sup>で一定の値を保つ(図-1)。これに対して病原細菌を $10^6$  CFU/mlの濃度で同様に接種した場合は、初期の菌密度はおよそ $10^{3.4}$  CFU/cm<sup>2</sup>であるが、1週間後には $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>を超える。非病原性細菌を噴霧接種1日後に病原細菌を処理した場合、非病原性細菌の定着菌密度は単独接種時と変わらないが、病原細菌の増殖は抑制される。逆に、病原細菌を接種後に非病原性細菌を処理した場合、病原細菌の増殖は抑制されず $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>を超えるが、非病原性細菌の定着菌密度は単独接種時とほぼ変わらない(図-2)。この結果は、非病原性細菌が植物に先に定着することで病原細菌の植物へ

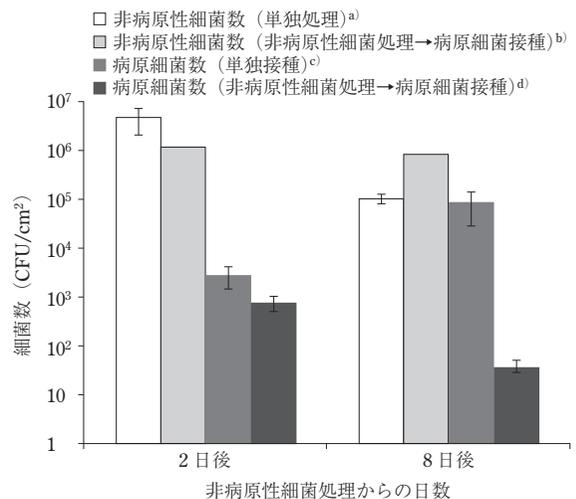


図-1 ハクサイ葉における非病原性細菌 11-100-01 株とアブラナ科黒腐病菌の増殖

a) 非病原性細菌を処理. b) 非病原性細菌処理の1日後に病原細菌を接種. c) 病原細菌を接種.

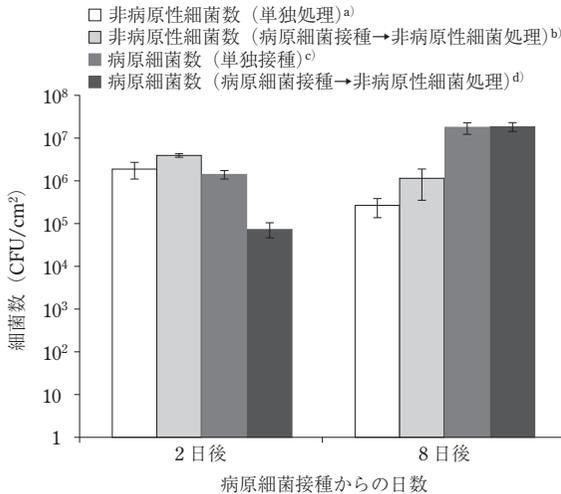


図-2 ハクサイ葉における非病原性細菌 11-100-01 株とアブラナ科黒腐病菌の増殖  
a) 非病原性細菌を処理. b) 病原細菌接種の1日後に非病原性細菌を処理. c) 病原細菌を接種.

の定着を抑制することが防除効果の主因であることを示している。

非病原性細菌と植物体との相互作用について、抵抗性誘導に関係する遺伝子群の発現解析を行っているが、植物体側の抵抗性誘導の関与も発病抑制に関係していることを示す結果も得られつつある(中保ら, 2014)。

非病原性細菌が病原細菌に対して直接抗菌活性を持つか調査を行ったところ、一部の *Xanthomonas* 属病原細菌に対しては抗菌活性を持つことが明らかとなった(森本ら, 2014)。しかし、抗菌活性と発病抑制効果に相関は認められず、発病抑制に関係するかは不明である。

### III 発病抑制効果の認められる病害

我々が微生物農薬の開発に用いている 11-100-01 株と 11-110-01 株について、発病抑制効果のある病害を調査した結果、アブラナ科黒腐病(キャベツ、ハクサイ、ブロッコリーで試験)、レタス斑点細菌病、モモせん孔細菌病、カンキツかいよう病で発病抑制効果が認められ、11-100-01 株の試作製剤を用いた圃場での防除試験を行っている。また、ポット試験ではトマト斑点細菌病、ダイズ葉焼病に対する発病抑制効果も確認している。さらに、11-100-01 株では *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* によって引き起こされるアブラナ科黒斑細菌病に対しても病原細菌の定着と増殖を抑制し(図-3)、発病抑制効果があることをポット試験によって確認されており、*Xanthomonas* 属細菌以外によって引き起こされる病害以

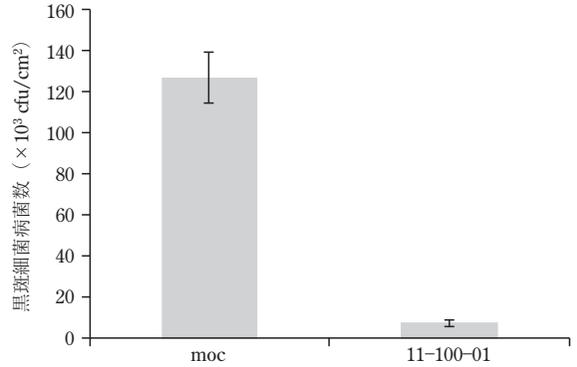


図-3 ハクサイ葉におけるアブラナ科黒斑細菌病菌の定着数  
病原細菌処理1日前に水(moc)と非病原性細菌(11-100-01)を処理.

外にも応用できる可能性がある。

### おわりに

非病原性 *Xanthomonas* 属細菌を用いた微生物農薬の開発試験は、多くの病害、特に果樹類に対して防除効果を持ち、発病抑制の作用機作が明らかとなるなど順調に進行している。

また、11-100-01 株の試作製剤を使用した防除試験後に土壌を採取し、微生物相を Bio-Log や PCR-DGGE を用いて無処理、既存の銅剤処理と比較を行った結果、いずれとも差が認められず、環境に対する負荷が少ないと考えられる。このように微生物農薬の開発にかかわる試験研究は順調に進んでいるが、市販化を目指すうえで解決しなければならない問題がいくつか存在する。その一つが製剤の保存安定性向上である。この点については現在前述の通り凍結乾燥による水和剤と、細菌懸濁液による液体製剤の検討を行っており、保存安定性向上につながる添加成分の探索を進めている。もう一つが、製剤化コストを削減し経済性を高めることであり、これについては現在の処理濃度からさらに低い成分菌濃度で効果を発揮できるよう、処理方法についての検討を進めている。

### 引用文献

- 1) BULL, C. T. et al. (2010): J. Plant Pathol. **92**: 551 ~ 592.
- 2) GONZALEZ, C. et al. (2002): FEMS Microbiol. Lett. **215**: 23 ~ 31.
- 3) 井上康宏ら (2009): 生物機能を活用した病害虫・雑草管理と肥料削減: 最新技術集, 農研機構 中央農業研究センター, つくば, p. 125 ~ 128.
- 4) 森本絢子ら (2013): 日植病報 **79**: 247.
- 5) ———ら (2014): 平成 26 年日本植物病理学会大会講演要旨 予稿集: 171.
- 6) 中保一浩ら (2014): 同上: 170.
- 7) VAUTERIN, L. et al. (1996): System. Appl. Microbiol. **19**: 96 ~ 105.
- 8) YUSUF, Y. and M. SALLY (2004): Plant Pathol. J. **3**: 52 ~ 55.