

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K18657

研究課題名(和文) タバコ病害抵抗性誘導機構を活性化するキノコ揮発性物質の探索とその作用機構

研究課題名(英文) Search for mushroom volatiles that activated disease resistance induction mechanism on tobacco

研究代表者

大崎 久美子 (OSAKI, Kumiko)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：20432601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：多種多様なきのこ由来揮発性物質の中からタバコの病害抵抗性誘導活性を示す物質を生産するきのこ8菌株を選抜した。そのうち5菌株の粗揮発性物質がタバコに前処理することにより、*Botrytis cinerea*の発病を顕著に抑制した。発病抑制効果が認められたヤマブシタケとウチワタケの粗揮発性物質処理によって、タバコの病害抵抗性関連遺伝子の発現が対照区と比較して向上した。また、これら粗揮発性物質は*B. cinerea* 胞子発芽に対しても抑制効果が認められた。このことより、ヤマブシタケおよびウチワタケが生産する揮発性物質はタバコの病害抵抗性を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数種のきのこが生産する揮発性物質が植物の病害抵抗性を誘導することを明らかにしたことは、本研究が初めての報告であり、学術的意義がある。本研究結果によりヤマブシタケおよびウチワタケ由来揮発性の抵抗性誘導物質は、広範囲の病害に有効であることが予想される。また従来の抵抗性誘導剤では薬害が大きな問題となっているが、揮発性物質の特徴により通気によって消失し残留性がなく、さらに処理量の調節が容易であるため、薬害の問題は解決できると考えている。そのため、きのこ由来揮発性の抵抗性誘導剤は、新たな環境低負荷型の病害防除資材として期待できる点に社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we screened eight mushrooms that produce substances exhibit resistance-inducing activity on tobacco from volatiles of various mushrooms. Of which, the lesion formation of *Botrytis cinerea* on tobacco leaves were significantly suppressed for pretreatment with crude volatiles of five mushrooms. The expression of disease resistance related genes on tobacco was improved by treatment with crude volatiles of *Hericium erinaceus* (Yamabushitake) and *Microporus affinis* (Uchiwatake), which were showed disease suppression of *B. cinerea*. In addition, these crude volatiles were also found to inhibit spore germination of *B. cinerea*. This study revealed that the volatiles produced by *H. erinaceus* and *M. affinis* induce disease resistance on tobacco.

研究分野：植物病理学

キーワード：揮発性物質 きのこ 病害抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農作物の病害防除は病原菌を直接殺す殺菌剤の利用に大きく依存しているが、殺菌剤の利用は健康や環境への影響が懸念されるため、殺菌剤に依存しない環境低負荷型の防除技術の開発が望まれている。その1つとして、植物が本来備わっている病害抵抗性を誘導し病害を防ぐ『抵抗性誘導剤』の開発に期待が集まっている。抵抗性誘導剤は直接的に病原菌を死滅させず広範囲の病原菌に効果を示すこと、また殺菌剤使用の際に問題となる薬剤耐性菌の出現リスクが低いこと等の優れた特徴がある。

菌類は商業・産業に利用可能な遺伝資源の宝庫であり、未知の優れた能力を多く秘めている。なかでも、菌類の生産する抗菌性物質は医薬や農薬に抗生物質として利用されてきた。これらの抗生物質は非揮発性のものがほとんどであるが、菌類であるきのこ類の多くが周囲に広く拡散する揮発性の抗菌物質を生産し、数種の食用きのこが放出する揮発性物質が10種類以上の植物病原菌に対して抗菌活性を示すことを我々はこれまでに明らかにした(①, ②)。きのこ類が生産する揮発性物質の中には植物の抵抗性誘導活性を示すものが存在する可能性が極めて高いものと思われるが、きのこ類由来の揮発性物質による抵抗性誘導についての研究例は全くない。そこで、本研究ではモデル植物であるタバコを用い、病害抵抗性を誘導するきのこ由来の揮発性物質を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、モデル植物のタバコの病害抵抗性を誘導するきのこ由来揮発性物質を探索し、その抵抗性誘導メカニズムの解析を通して病害防除資材としての有効性を評価することである。

3. 研究の方法

(1) 植物の病害抵抗性誘導活性をもつきのこ由来揮発性物質の選抜

本研究にはタバコの病害抵抗性遺伝子PR1aおよびPI-IIプロモーターとGUSレポーター遺伝子との融合遺伝子をそれぞれ導入した2種類の組み換えタバコ植物(PR-GUS, PI-GUS)を用いた。また、35属44種60菌株きのこ菌株(表1)の培養濾液より有機溶媒抽出により粗揮発性物質を調製した。各種きのこ由来粗揮発性物質と既存のきのこ由来揮発性物質処理による組み換えタバコ植物における病害抵抗性誘導活性を、GUS活性を指標に調査した。

(2) きのこ由来揮発性物質処理による病原菌感染抑制効果の検討

きのこ由来粗揮発性物質をタバコ野生型に噴霧処理1日後に、*Botrytis cinerea* 孢子懸濁液を接種し、接種4日後に発病を観察した。また、各種病原菌の孢子発芽に対する抗菌活性についても調査した。

(3) きのこ由来揮発性物質による病害抵抗性誘導機構の解析

きのこ由来粗揮発性物質をタバコ野生型に処理し24時間後の抵抗性関連遺伝子(PR-1, PR-2, PI-II, PRB)の発現量をリアルタイムPCRで解析した。

4. 研究成果

(1) 植物の病害抵抗性誘導活性をもつきのこ由来揮発性物質の選抜

組み換えタバコ植物(PR-GUS, PI-GUS)の切り取り葉に、きのこ由来粗揮発性物質と2種の既存きのこ由来揮発性物質(1-phenyl-3-pentanone, isovelleral)を処理した。処理後にGUS活性を染色法により視覚的に葉の染色を5段階(0:なし, 1:葉縁のみ, 2:葉面積30%以下, 3:葉面積50%以下, 4:葉全体)で評価した。対照区としてGUSレポーター遺伝子のみを導入した組み換えタバコを用いた。染色法において、対照区と比較してGUS活性が高いきのこ3菌株の粗揮発性物質を選抜したが、これらの粗揮発性物質を前処理したタバコにおいて*Botrytis cinerea*の発病抑制効果が認められなかった。そのため、選抜方法の再検討を行い、GUS活性を蛍光測定法により定量した(表1)。その結果、対照区と比較して顕著な活性が認められ、さらに培養しやすいきのこ8菌株(TUFC12867, 11951, 11271, 11757, 13736, 30182, 11423, 11893)の粗揮発性物質を選抜した。またisovelleralにおいても、GUS活性が認められた。

(2) きのこ由来揮発性物質処理による病原菌感染抑制効果の検討

選抜したきのこ8菌株の粗揮発性物質(2 mg/ml または 5mg/ml)をタバコ野生型に前処理し24時間後に*Botrytis cinerea* 孢子懸濁液を接種し発病抑制効果を調べた。濃度2 mg/ml 処理において、アラゲキクラゲ(TUFC12867)、ウチワタケ(TUFC13736)およびヒラタケ(TUFC11893)ではそれぞれ抑制率54%、47%および42%であり、濃度5 mg/ml 処理ではヤマブシタケ(TUFC11271)とエノキタケ(TUFC11951)が抑制率83%および82%であった。これらのきのこ由来粗揮発性物質の前処理により*B. cinerea*の発病抑制効果が認められたことより、粗揮発性物質中に病害抵抗性誘導活性を有する物質が存在していることが示唆された。抵抗性誘導活性を有するきのこ5菌株のうちアラゲキクラゲ以外のきのこ粗揮発性物質は*B. cinerea* 孢子発芽に対しても顕著な抑制効果が認められた。5菌株の中で*B. cinerea*の発病抑制効果が高かったヤマブシタケ粗揮発性物質より抵抗性誘導物質の単離および同定を現在、行っている。

表1. きのこ由来揮発性物質処理によるタバコ組み換え植物におけるGUS活性(蛍光測定法)

No.	きのこ属種名種	和名	TUFC No.1)	GUS活性2)	
				PR1a-GUS	PI-GUS
1	<i>Agaricus abruptibulbus</i>	ウスキモリノカサ	33256	0.2	1.8
2	<i>Armillaria tabescens</i>	ナラタケモドキ	30939	0.7	0.2
3	<i>Auricularia auricula</i>	キクラゲ	100803	0.9	0.9
4	<i>Auricularia polytrica</i>	アラゲキクラゲ	12867	4.8	0.3
5	<i>Boletus reticulatus</i>	ヤマドリタケモドキ	100118	0.7	0.6
6	<i>Calvatia craniiformis</i>	ノウタケ	32388	0.8	1.1
7	<i>Climacodon septentrionalis</i>	エゾハリタケ	10590	1.5	1.0
8	<i>Cystoderma amianthinum</i>	シワカラカサタケ	31412	1.5	0.1
9	<i>Cystoderma amianthinum</i>	シワカラカサタケ	31558	1.2	0.8
10	<i>Daedaleopsis styracina</i>	エゴノキタケ	31417	0.8	0.8
11	<i>Flammulina valutipes</i>	エノキタケ	100561	0.9	1.0
12	<i>Flammulina valutipes</i>	エノキダケ	11951	2.9	0.2
13	<i>Fomes fomentarius</i>	ツリガネタケ	32838	0.2	1.8
14	<i>Fomes fomentarius</i>	ツリガネタケ	33594	0.1	0.9
15	<i>Fomitopsis pinicola</i>	ツガサルノコシカケ	30417	0.6	0.2
16	<i>Fomitopsis pinicola</i>	ツガサルノコシカケ	33581	0.9	0.1
17	<i>Gloiothele citrina</i>	キヌシブカワタケ	11763	0.4	0.1
18	<i>Gloiothele citrina</i>	キヌシブカワタケ	14056	3.6	0.1
19	<i>Grifola frondosa</i>	マイタケ	100821	0.7	0.6
20	<i>Gyrodon lividus</i>	ハンノキイグチ	100914	1.2	1.2
21	<i>Hebeloma radicosum</i>	ナガエノスキタケ	34136	0.5	2.0
22	<i>Hericiium botryoides</i>	ハナヤマブシタケ	34500	0.2	0.7
23	<i>Hericiium botryoides</i>	ハナヤマブシタケ	34501	0.4	0.1
24	<i>Hericiium coralloides</i>	サンゴハリタケ	12790	0.3	0.1
25	<i>Hericiium erinaceus</i>	ヤマブシタケ	11271	1.9	3.9
26	<i>Hericiium erinaceus</i>	ヤマブシタケ	11292	0.7	0.1
27	<i>Hypsizigus marmoreus</i>	ブナシメジ	11757	0.3	1.7
28	<i>Hypsizigus marmoreus</i>	ブナシメジ	11906	0.2	1.2
29	<i>Hypsizigus marmoreus</i>	ブナシメジ	11906	0.6	0.7
30	<i>Ischnoderma resinosum</i>	ヤニタケ	14282	0.5	0.4
31	<i>Lentimula edodes</i>	シイタケ	100154	0.8	0.9
32	<i>Lepista nuda</i>	ムラサキシメジ	10637	0.9	2.5
33	<i>Lopharia spadicea</i>	オリーブウロコダケ	10857	0.6	0.2
34	<i>Microporus affinis</i>	ウチワタケ	13736	8.2	0.5
35	<i>Mycoleptodonoides aitchisonii</i>	ブナハリタケ	11027	0.6	0.8
36	<i>Omphalotus japonicus</i>	ツキヨタケ	30244	0.3	0.2
37	<i>Oudemansiella mucida</i>	ヌメリツバタケモドキ	32976	0.6	0.5
38	<i>Phallus impudicus</i>	スッポントケ	13273	0.7	0.1
39	<i>Phallus impudicus</i>	スッポントケ	100608	0.3	0.2
40	<i>Pholiota adiposa</i>	ヌメリスキタケ	30182	0.7	1.4
41	<i>Pholiota lubrica</i>	チャナメツムタケ	11423	4.9	2.1
42	<i>Pholiota lubrica</i>	チャナメツムタケ	30280	0.8	0.7
43	<i>Pholiota nameko</i>	ナメコ	100139	0.5	0.5
44	<i>Piptoporus soloniensis</i>	シロカイメンタケ	14500	1.8	0.4
45	<i>Piptoporus betulinus</i>	カンバタケ	30414	0.8	0.1
46	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	タモギダケ	30152	0.6	0.6
47	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ヒラタケ	11893	0.3	3.0
48	<i>Pleurotus ostreatus</i>	ヒラタケ	11893	1.2	0.7
49	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ウスヒラタケ	100262	0.6	0.1
50	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ウスヒラタケ	100268	0.6	0.2
51	<i>Polyporus tuberaster</i>	タマチヨレイタケ	34735	1.1	0.0
52	<i>Scytinostroma galactinum</i>	チチイロコウヤクダケ	33863	0.4	0.6
53	<i>Strobilurus ohshimae</i>	スキエダタケ	12963	0.9	0.6
54	<i>Trametes lactinea</i>	チチイロアマタケ	13810	0.6	0.8
55	<i>Trametes lactinea</i>	チチイロアマタケ	13794	1.8	0.5
56	<i>Trametes suaveolens</i>	シロアマタケ	33574	0.2	1.1
57	<i>Trametes suaveolens</i>	シロアマタケ	14448	1.5	0.2
58	<i>Tremella foliaces</i>	ハナビラニカワタケ	14251	1.0	0.5
59	<i>Tricholoma matsutake</i>	マツタケ	30604	1.0	0.9
60	<i>Tricholoma matsutake</i>	マツタケ	31015	0.9	0.6
61	1-phenyl-3-pentanone			0.8	0.1
62	isovelleral			1.3	1.6

1) 鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター保有番号

2) GUS活性を蛍光測定法で測定し、対照区と比較した相対値で評価した。

また、既存のきのこ由来揮発性抗菌物質(1-phenyl-3-pentanone, isovelleral, 3-octanone)における抵抗性誘導活性を調査した結果、顕著な抵抗性誘導活性は見出せなかった。しかし、本研究課題を実施中に、新たに各種植物病原菌および病原細菌に対して高い抗菌活性を示す抗菌物質として、オリーブウロコダケ粗揮発性物質から3,5-dichloro-4-methoxybenzaldehydeを同定した。現在、本物質の抵抗性誘導活性について調査中である。さらに、食用きのこ栽培において排出される廃培地(廃菌床)から放出される各種きのこ由来揮発性物質の前処理によりArabidopsis葉への*Alternaria brassicicola*感染が抑制されることを見出し、廃菌床から放出される揮発性抗菌物質6種(Butyric acid, 1-octen-3-ol, Guaiacol, skatole, 6-amyl-2-pyrone, 2,4-Di-tert-butylphenol, γ -Dodecalactone)を同定した。これら揮発性物質におけるタバコにおける抵抗性誘導活性についても調査を行う予定である。

(3)きのこ由来揮発性物質による病害抵抗性誘導機構の解析

抵抗性誘導活性を有するきのこ5菌株のうちヤマブシタケとウチワタケの粗揮発性物質をタバコ野生型に処理し24時間後の抵抗性関連遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで解析した。その結果、両方の粗揮発性物質処理により、対照区と比較して全ての遺伝子の発現が向上していた(図1および図2)。モデル植物であるタバコの病虫害抵抗性誘導機構についてはこれまで良く研究されている。タバコにおける殺生型(necrotrophic)病原体や害虫に対して抵抗性を誘導するジャスモン酸(JA)経路を、または活物寄生型(biotrophic)病原体に対して抵抗性を誘導するサリチル酸(SA)経路を活性化するかについて解析を行うことにより、適用病原体の範囲を推定することができる。本研究により、ヤマブシタケおよびウチワタケ粗揮発性物質処理によりSA誘導性遺伝子(酸性PR-1, PR-2)とJA誘導性遺伝子(PR-B, PI-II)の両方が対照区よりも発現しており、これらの揮発性物質は広範囲の病害に対して有効な抵抗性を誘導する可能性がある。本研究で殺生型病原菌である*B. cinerea*の発病抑制効果については明らかにしたが、ウイルスなどの活物寄生型病原体に対する抑制効果は不明であるため、今後、調査する必要がある。

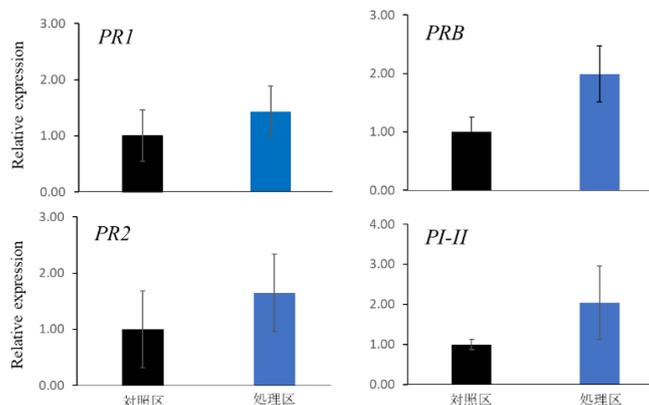


図1. ヤマブシタケ粗揮発性物質処理によるタバコの病害抵抗性関連遺伝子の発現解析
粗揮発性物質5mg/mlをタバコに噴霧処理し24時間後に、各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで解析した。なお、対照区は水を同様に処理した。

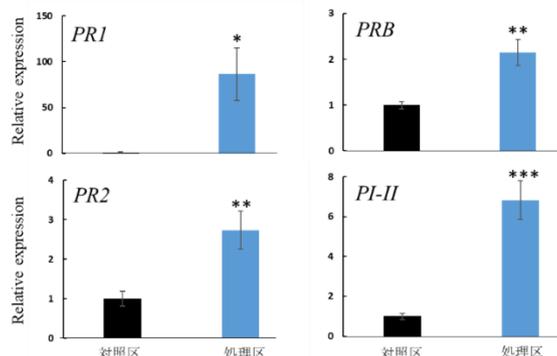


図2. ウチワタケ粗揮発性物質処理によるタバコの病害抵抗性関連遺伝子の発現解析
粗揮発性物質5mg/mlをタバコに噴霧処理し24時間後に、各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRで解析した。なお、対照区は5%メタノール溶液を同様に処理した。
t検定により、***:0.1%, **:1%, *:5%, で対照区との間に有意差があることを示す。

(4)今後の展望

本研究では、数種のきのこが生産する揮発性物質が植物の病害抵抗性を誘導することを明らかにした。本研究成果によりヤマブシタケおよびウチワタケ由来揮発性の抵抗性誘導物質は、広範囲の病害に有効であることが予想される。今後、これらきのこ由来揮発性の抵抗性誘導物質の同定を進める予定である。従来の抵抗性誘導剤では薬害が大きな問題となっているが、揮発性物質の特徴により通気によって消失し残留性がなく、さらに処理量の調節が容易であるため、薬害の問題は解決できると考えている。そのため、きのこ由来揮発性の抵抗性誘導剤は、新たな環境低負荷型の病害防除資材として期待できる。

<引用文献>

- ①Oka, K., Shimomura, N., Maekawa, N., Nakagiri, A. and Otani, H.: Antifungal activity of 1-phenyl-3-pentanone produced by *Mycoleptodonoides aitchisonii* against plant-pathogenic fungi. *Mushroom Science and Biotechnology*, 22:98-100, 2014.
- ②Oka, K., Ishihara, A., Sakaguchi, N., Nishino, S., Roxana, R. Y., Nakagiri, A. and Otani, H.: Antifungal activity of volatile compounds produced by an edible mushroom *Hypsizygus marmoreus* against phytopathogenic fungi. *Journal of Phytopathology*, 163:987-996, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kumiko Osaki-Oka, Sayaka Suyama, Emi Sakuno, Shuji Ushijima, Eiji Nagasawa, Nitaro Maekawa & Atsushi Ishihara	4. 巻 85
2. 論文標題 Antifungal activity of the volatile compound isovelleral produced by ectomycorrhizal Russula fungi against plant-pathogenic fungi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 428-435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-019-00872-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamamoto E., Kimura N., Nishino S., Ishihara A., Otani H., Osaki Oka K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Antimicrobial activity of the volatile compound 3,5 dichloro 4 methoxybenzaldehyde, produced by the mushroom Porostereum spadiceum, against plant pathogenic bacteria and fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jam.15020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱本恵実里・藤田里菜・石原亨・大崎久美子
2. 発表標題 各種きのこ由来揮発性物質のトマト青枯病細菌に対する抗菌活性
3. 学会等名 第45回日本農薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田里菜・宇部尚樹・福島（作野）えみ・手林慎一・大崎久美子・石原 亨
2. 発表標題 廃菌床由来の揮発性物質によるシロイヌナズナの病害抑制
3. 学会等名 第45回日本農薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤郁奈・村田晃一・小久保悠・森本紀子・宇部尚樹・上野誠・上野琴巳・大崎久美子・石原亨
2. 発表標題 きのご廃菌床抽出物によるイネの防御応答の誘導
3. 学会等名 日本農薬学会第43回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大崎久美子・田中陽子・松村和洋・石原亨
2. 発表標題 ナメコ廃菌床処理によるトマト灰色かび病に対する抑制効果
3. 学会等名 日本きのご学会第22回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤典子・吉川実沙・宇部尚樹・上野琴巳・大崎久美子・石原亨
2. 発表標題 シイタケ廃菌床抽出物の植物病害防除効果と抗菌活性物質の単離
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤郁奈・小久保悠・村田晃一・森本紀子・宇部尚樹・上野誠・手林慎一・上野琴巳・大崎久美子・石原亨
2. 発表標題 きのご廃菌床抽出物によるイネの防御応答の誘導
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大崎久美子・尾谷浩	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シ・エムシ・出版	5. 総ページ数 8ページ
3. 書名 第10章 きのご由来揮発性物質の植物病原菌類に対する抗菌作用・天然系抗菌・防かび剤の開発と応用 (坂上吉一監修)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------