

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03778

研究課題名(和文)ブドウ根頭がんしゅ病新規拮抗細菌の防除機構の解明

研究課題名(英文) Insights into the mechanism of biocontrol for grapevine crown gall

研究代表者

川口 章 (KAWAGUCHI, Akira)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・西日本農業研究センター・上級研究員

研究者番号：80520486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原細菌 *Rhizobium vitis* によって起こるブドウ根頭がんしゅ病は世界中で発生しているがこれまで有効な防除法がない。我々が発見した、本病の発生を強く抑制する拮抗細菌 *R. vitis* VAR03-1株とARK-1株について、その拮抗作用機構解明に取り組んだ。両菌株は病原細菌の複数の病原性遺伝子の発現を強く抑制した。特にVAR03-1株は分子量10万以上の画分を含む培養濾液でも病原性遺伝子や病原細菌の増殖を抑制した。この結果から、VAR03-1株は高分子量タンパク質が拮抗作用に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病害であるブドウ根頭がんしゅ病はこれまで有効な防除方法がなかったが、我々が発見した拮抗細菌はそれに対する唯一の対策になりうることから、世界中でその実用化が期待されている。その防除作用機構の一部が、抗生物質等による殺菌ではなく、病原菌の遺伝子発現抑制であることは新しい発見であり、農薬、医薬で問題になっている抗生物質耐性病原菌の出現を抑制に大きく貢献できる。本研究の成果が、植物病害だけでなく動物、人間の感染症に対する新しい防除・治療技術開発の基礎的知見としても活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Crown gall of grapevine, which is caused by tumorigenic *Rhizobium vitis* (Ti), is the most important bacterial disease of grapevine throughout the world. Previously, we discovered that nonpathogenic *R. vitis* strain VAR03-1 and ARK-1 were a biocontrol agent that suppress grapevine crown gall disease caused by a Ti strain. The objective of this study is to provide insights into the mechanism of biocontrol for grapevine crown gall by VAR03-1 and ARK-1. Both strains were able to strongly suppress several virulence genes expression of Ti. In the case of strain VAR03-1, also, both the expression of the virulence gene and growth of Ti were suppressed in vitro when it was cultivated in the VAR03-1 culture filtrate. Both activities were detected in the >100,000 molecular weight fraction of the filtrate. Our results suggest that the antagonistic effects of VAR03-1 on Ti are mediated by huge particle(s) consisting of multiple proteins released in the culture media.

研究分野：植物病理学

キーワード：根頭がんしゅ病 ブドウ 拮抗細菌 生物防除 防除作用機構 メカニズム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブドウは果物やワイン原料として世界規模で重要な農作物だが、ブドウ根頭がんしゅ病により毎年約 10%が喪失する。ワイン消費の増加に伴う原料不足が著しい中、有効な防除策が無い本病の防除技術開発が切望されている。申請者は本病に対する新規拮抗細菌 *Rhizobium vitis* VAR03-1 株と ARK-1 株 (以下、拮抗細菌株) を発見した。本菌は実用に耐える防除効果を発揮する世界初の拮抗菌であり、現在、生物農薬として開発中である。しかし、この防除機構には未だ不明な点が多く、本菌株の植物中における動態も明らかでない。そこで本研究では植物体内における根頭がんしゅ病拮抗細菌の動態および分子レベルでの防除機構の解明を行う。本成果は当該菌株の有効施用や他種作物での有望菌株選抜に必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、根頭がんしゅ病拮抗細菌株の分子レベルでの防除機構の解明である。具体的には以下の2つである。

(1) 拮抗細菌株と根頭がんしゅ病菌に各々異なる蛍光タンパク質遺伝子を導入後、閉鎖系でブドウ実生苗に接種し、その動態を観察する。また、拮抗細菌株による根頭がんしゅ病菌の病原性関連遺伝子発現の抑制範囲を明らかにする。

(2) 拮抗細菌株が根頭がんしゅ病菌に対して発揮する菌体増殖抑制効果、および病原性遺伝子発現抑制効果に関わる遺伝子を解明する。

これらを明らかにするために以下の研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 接合用トランスポゾンベクターを用いて、*R.vitis* を形質転換させるために最適な接合伝達法を探索するとともに、拮抗細菌株と根頭がんしゅ病菌に発光遺伝子 (GFP と RFP) を導入した形質転換株を作成した。

(2) アセトシリシリンゴンを添加した液体培地での両菌株の混合培養における *in vitro* 条件およびブドウに有傷接種する *in vivo* 条件において、主要病原性関連遺伝子の mRNA の発現量を RT-qPCR により定量し、拮抗細菌株がそれら遺伝子の発現に与える影響を調査した。

(3) 拮抗細菌株の遺伝子破壊変異株を作成し、拮抗能を喪失した変異株を選抜、破壊された遺伝子を特定した。また、培養液を複数の画分で濾過し、拮抗能を有する高分子化合物を調査した。

(4) 根頭がんしゅ病菌、拮抗細菌 2 菌株、非病原性で非拮抗性の菌株の 4 種類の全ゲノム配列を次世代シーケンサーによる *de novo* 解析によって決定し、配列構造を解析した。

4. 研究成果

(1) 拮抗細菌株と根頭がんしゅ病菌に発光遺伝子 (GFP と RFP) を導入した形質転換株を作成することに成功した。また、それらが本来の拮抗作用や、根頭がんしゅ病菌本来の病原性、定着性が野生株と同じであることを生物検定で確認した。今後、植物体への導入とその動態の観察等の研究を継続する予定である。

(2) 拮抗細菌株 (ARK-1 株) と根頭がんしゅ病菌株 (図 1 では Ti として表記) 混合接種した部位における根頭がんしゅ病菌株の *virA*, *virD3*, *virG* の発現量は、根頭がんしゅ病菌株単独接種と比較して有意に低かった (図 1)。また、非拮抗細菌株 (VAR06-30 株) と根頭がんしゅ病菌株を混合接種した部位における *virA*, *virD3*, *virG* の発現量は、根頭がんしゅ病菌株単独接種の発現量とほぼ同じであり、拮抗細菌株との混合接種の発現量より有意に多かった (図 1)。特に *virA* は根頭がんしゅ病菌株が植物の傷口を認識する受容体タンパク質をコードしている遺伝子であり、この遺伝子の発現がなければそれ以降の病原性遺伝子の発現は起こらないと考えられることから、拮抗細菌株は Ti 株の *vir* 領域全体の発現を抑制している可能性が示唆された。

また、VAR03-1 株についても、根頭がんしゅ病菌株の病原性関連遺伝子 *virE2* の発現抑制が *in vitro* および *in vivo* の両方で認められた。

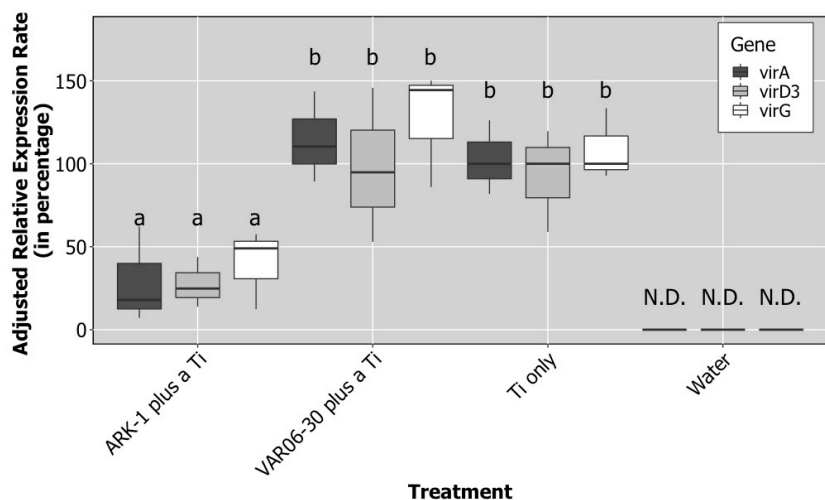


図 1 根頭がんしゅ病菌の病原性関連遺伝子の発現量(相対比較) 根頭がんしゅ病菌株の単独接種の発現量を 100%とした相対比較。

バーは 95%CI、ボックスは中央値と $Q_{1/4}$ – $Q_{3/4}$ を示す。GLMM test ($p < 0.05$)

(3) 拮抗細菌株 (VAR03-1 株) の遺伝子破壊変異株を作出し、拮抗能を喪失した変異株を選抜、破壊された遺伝子を特定した結果、遺伝子はチロシン様タンパク質をコードしていることが明らかになった。今後、その遺伝子の復元を行い、拮抗能の回復試験を行う予定である。また、VAR03-1 株は分子量 10 万以上の画分を含む培養濾液でも病原性遺伝子や病原細菌の増殖を抑制した。この結果から、VAR03-1 株は高分子量タンパク質が拮抗作用に関与している可能性が示唆された。

(4) 根頭がんしゅ病菌、拮抗細菌株 (VAR03-1 株)、非病原性で非拮抗性の菌株の 3 種類の全ゲノム配列を比較した結果、拮抗細菌株は多くの病原性関連遺伝子を欠損していることが明らかになった。また、チロシン様タンパク質をコードしている遺伝子群は上記 4 種類の菌種全てに存在しているが、それぞれの菌種で変異が起こっていることから、タンパク質の機能に差があると推定され、それが拮抗能の表現型に関係していると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawaguchi A, Nita M, Ishii T, Watanabe M, Noutoshi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Biological control agent Rhizobium (=Agrobacterium) vitis strain ARK-1 suppresses expression of the essential and non-essential vir genes of tumorigenic R. vitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-018-4038-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Saito K, Watanabe M, Matsui H, Yamamoto M, Ichinose Y, Toyoda K, Kawaguchi A and Noutoshi Y	4. 巻 84
2. 論文標題 Characterization of the suppressive effects of the biological control strain VAR03-1 Rhizobium vitis on the virulence of tumorigenic R. vitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 58-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-017-0756-1	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 Kawaguchi A, Inoue K, Tanina K, Nita M	4. 巻 93
2. 論文標題 Biological Control for Grapevine Crown Gall using Nonpathogenic Rhizobium vitis Strain ARK-1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of Japan Academy Series B	6. 最初と最後の頁 547-560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.93.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 川口 章・石井 智也・渡邊 恵・能年 義輝
2. 発表標題 非病原性Rhizobium vitis ARK-1株によるブドウ根頭がんしゅ病菌のvir領域の発現抑制（第2報）
3. 学会等名 日本植物病理学会関西部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井智也・渡邊恵・齋藤晶・松井英讓・山本幹博・一瀬勇規・豊田和弘・川口章・能年義輝
2. 発表標題 非病原性Rhizobium vitis VAR03-1株によるブドウ根頭がんしゅ病の病原性関連遺伝子の発現抑制
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口 章・能年義輝
2. 発表標題 非病原性Rhizobium vitis ARK-1株がブドウの抵抗性誘導関連遺伝子発現に与える影響について .
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤 晶, 渡邊 恵, 松井 英讓, 山本 幹博, 一瀬 勇規, 豊田 和弘, 川口 章, 能年 義輝
2. 発表標題 バイオコントロール細菌Rhizobium vitis VAR03-1株のブドウ根頭がんしゅ病抑制機構の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Kawaguchi, Mizuho Nita, Tomoya Ishii, Megumi Watanabe, Yoshiteru Noutoshi
2. 発表標題 Biological control agent, Rhizobium (=Agrobacterium) vitis strain ARK-1 suppresses expression of the essential and non-essential vir genes of a tumorigenic R. vitis.
3. 学会等名 Plant Health 2019, APS Annual Meeting, OH, USA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wong AT, Kawaguchi A, Nita M
2. 発表標題 Biological Control Agent Rhizobium (=Agrobacterium) vitis ARK-1 Reduces Crown Gall of Grapevine Induced by Single-Isolate in Virginia
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi A, Yoshitetu N, Mizuho N
2. 発表標題 Biological Control for Grapevine Crown Gall by Nonpathogenic Rhizobium vitis Strain ARK-1.
3. 学会等名 ICPP2018, Boston, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawaguchi, A
2. 発表標題 Biological control for grapevine crown gall by nonpathogenic Rhizobium vitis strain ARK-1
3. 学会等名 93rd Cumberland-Shenandoah Fruit Workers Conference 2017, VA, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	能年 義輝 (NOUTOSHI Yoshiteru) (70332278)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授 (15301)	