

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08176

研究課題名（和文）植物保護細菌の能力増強メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of antibiotics biosynthesis in plant-protecting bacteria

研究代表者

染谷 信孝（Nobutaka, Someya）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：60360575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：植物根圏から分離した複数の抗生物質産生Pseudomonas属細菌における、個々の抗生物質生成能に対する他の抗生物質産生能の影響を解析した。2,4-diacetylphloroglucinol等の一部の抗生物質においては他の抗生物質生成能を欠失すると、過剰産生する表現型が得られ、その原因がsmall RNA等による包括的な二次代謝産物生成調節機構による可能性が判明した。異なる抗生物質に対する植物病原体の感受性は異なるため、本現象の解明は防除対象とする植物病害に対する植物保護細菌の作用を増強する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物機能を利用した植物病害の防除法、生物防除は農業において化学殺菌剤の使用量低減に貢献する。自然界において、細菌は抗菌性二次代謝産物、いわゆる抗生物質を産生して周辺の微生物と競合しながら生活している。本成果は、植物病原体に対して阻害効果を有する複数の抗生物質産生能を保有する細菌において、その産生能を増強させるメカニズム解明を行った。本成果は生物農薬候補となる野生株の細菌の能力をさらに高める可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We collected antibiotics-producing fluorescent pseudomonads isolates from phytospheres in Japan. We analyzed the role of specific antibiotics in multiple antibiotics-producing pseudomonads isolates. Production of antibiotics including 2,4-diacetylphloroglucinol by plant-protecting pseudomonads were enhanced by specific-gene deficient mutants. These phenomena was controlled under the control of small RNA regulation. Enhancement of antibiotic production play an important role in biological control of plant diseases.

研究分野：植物病理学

キーワード：生物防除 抗菌物質 生合成能 包括制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗生物質を産生する植物保護細菌は、植物病原体に対する生きた農薬、生物農薬になる可能性がある。しかしながら、植物病原体側も抗生物質に対する感受性が異なったり、産生する抗生物質の量が少ない場合には、生物農薬候補細菌の効果が十分に発揮されない可能性があった。植物保護細菌において産生する抗生物質の産生量を増強させることができれば生物農薬としての有効性が高まることが期待された。複数の抗生物質産生能を有する植物保護細菌株の場合、それぞれの生合成調節機構に対する他の抗生物質産生能の影響が不明な場合が多く、その解明は生物農薬開発のために必要だと考えられた。

2. 研究の目的

複数の抗生物質産生能を有する植物保護細菌、*Pseudomonas protegens* および *Pseudomonas chlororaphis* 種を材料として、特定の抗生物質産生能が他の抗生物質生合成発現にどのように影響するかを解明し、植物病原体に対して阻害的に働く抗生物質の産生増強とその制御機構解明を目指した。

3. 研究の方法

日本各地の農耕地生育植物根圏から抗生物質産生能を有する蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌を単離して研究材料とした()。収集した蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の中から、抗生物質である 2,4-diacetylphloroglucinol、pyoluteorin、pyrrolnitrin、phenazine-1-carboxylic acid、hydrogen cyanide、生合成遺伝子を有する細菌株 55 株を選抜し、それぞれの 16S rRNA 遺伝子配列から種の簡易同定を行うとともに、植物保護効果を確認した。特に植物保護効果が高かった *Pseudomonas protegens* および *Pseudomonas chlororaphis* 種およびそれぞれの近縁種株をモデル菌株として選抜した。*Pseudomonas protegens* および *Pseudomonas chlororaphis* 種菌株が保有する抗生物質生合成遺伝子群を確定するとともに、選抜菌株のゲノムを解読し、同種内もしくは異種間における共通、非共通遺伝子群を確定した。両種からモデル菌株を選抜し、それぞれの単独欠失もしくは複数欠失株を作出して、変異株の抗生物質産生能および植物病害からの保護効果を比較解析した(、 、)。

4. 研究成果

Pseudomonas protegens 種において、hydrogen cyanide およびその他特定の抗生物質生合成遺伝子の欠失は、2,4-diacetylphloroglucinol 等の他の抗生物質産生量を増強させ、キャベツの苗立枯病等に対する植物保護効果を増強させることが判明した。具体的には *Pseudomonas protegens* 種において抗菌物質 Hydrogen cyanide (HCN) および pyoluteorin (PLT) 遺伝子を欠失すると別な抗菌物質である 2,4-diacetylphloroglucinol (PHL) 産生量が增大して植物保護効果が増強していた。この際、HCN 株においては、二次代謝産物の包括的制御を担う small RNA 活性が増強されていることが判明した。一方、*Pseudomonas chlororaphis* 種では HCN 株において顕著な植物保護効果の増強は認められなかった。これは本種では PHL 産生

能がないことに起因する。*Pseudomonas chlororaphis* 種では抗菌物質 phenazine (PHZ) が主要な植物保護要因となるが、PHZ の産生増強は認められなかった。一方で HCN は *Pseudomonas chlororaphis* 種においても二次代謝産物産生能に影響を与えていることが明らかとなった。*Pseudomonas chlororaphis* 種における HCN は、鉄分キレート物質であるシデロフォア産生能を増強させていることが明らかとなった。HCN の欠失は植物保護細菌種の種を越えて、それぞれの種における二次代謝産物産生能へ影響を及ぼす可能性が推測されたことから、別途、実施者が単離した、HCN および PHL 産生能を保有する *Pseudomonas* spp. 株 [Os17 (*Pseudomonas saponiphia* 種近縁) St290 (*Pseudomonas brassicacearum* 種近縁)]

について、HCN 表原形質を検定した結果、*Pseudomonas protegens* 種と同様に PHL 産生能と植物保護効果の増強が認められた。これらの知見は、複数の抗菌性二次代謝産物生合成能を有する植物保護細菌について、植物保護効果を増強または改変させうる可能性を示した。

また、*Pseudomonas chlororaphis* 種については、4 亜種が報告されているが、本研究で研究対象とした *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* のゲノムを決定するとともに、他の 3 亜種における既知ゲノム報告株との比較ゲノム解析を行った結果、本種では抗菌性二次代謝産物生合成遺伝子およびその制御遺伝子群の有無が亜種によって異なることも判明した。本知見は、本種を生物農薬利用する際に、菌株の亜種に着目する必要性があることを示唆した。

引用文献

Nobutaka Someya, Masaharu Kubota, Kasumi Takeuchi, Yusuke Unno, Ryohei Sakuraoaka, Tomohiro Morohoshi (2020). Diversity of antibiotic biosynthesis genes-possessing rhizospheric fluorescent pseudomonads in Japan and their biocontrol efficacy. *Microbes and Environments* 35: ME19155

染谷信孝・竹内香純・諸星知広 (2019) 植物保護能力を有する蛍光性 *Pseudomonas* の機能と生態 . 化学と生物 57(9): 541-548

染谷信孝・諸星知広 (2019) *Pseudomonas chlororaphis* - 色づく植物保護細菌 . 土と微生物 73(1): 24-33

染谷信孝・諸星知広・竹内香純 (2017) *Pseudomonas protegens* - 植物の守護者と命名された細菌 . 土と微生物 71(2): 37-43

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 染谷信孝・諸星知広 | 4. 巻 73 |
| 2. 論文標題 Pseudomonas chlororaphis-色づく植物保護細菌 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 土と微生物 | 6. 最初と最後の頁 24-33 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 染谷信孝・諸星知広・竹内香純 | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Pseudomonas protegens - 植物の守護者と命名された細菌 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 土と微生物 | 6. 最初と最後の頁 37-43 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 1.Nobutaka Someya, Masaharu Kubota, Kasumi Takeuchi, Yusuke Unno, Ryohei Sakuraoka, Tomohiro Morohoshi | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Diversity of antibiotic biosynthesis genes-possessing rhizospheric fluorescent pseudomonads in Japan and their biocontrol efficacy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microbes and Environments | 6. 最初と最後の頁 ME19155 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） oi:10.1264/j sme2.ME19155 | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 染谷信孝・諸星知広・久勝順平・海野佑介・窪田昌春・竹内香純 |
| 2. 発表標題 「植物の守り菌」 - 日本産Pseudomonas protegensの探索と機能解析 |
| 3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 久勝順平・染谷信孝・竹内香純・諸星知広 |
| 2. 発表標題 植物保護効果を有するPseudomonas属細菌による抗菌物質生産制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 第69回日本生物工学会年次大会 |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |