

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05769

研究課題名(和文)植物病原菌の生体制御破壊型非殺菌性農薬の開発に向けた物質の同定及び作用機構解明

研究課題名(英文) Identification of substances and elucidation of mechanism of mode of action for the development of non-fungicidal controlling agent that destruction of biological control of plant pathogens

研究代表者

上野 誠 (Ueno, Makoto)

島根大学・学術研究院環境システム科学系・教授

研究者番号：00403460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、沖縄微生物ライブラリーに保存されている微生物の2次代謝産物が、イネいもち病菌の付着器やその他の植物病原菌の侵入部位に作用することにより、病気の発生を抑制できることを明らかにした。また、微生物の2次代謝産物に含まれる活性物質は、Streptomyces属菌の複数の種が異なる条件下で生産できることや熱及び酸に安定な高分子の物質であることが明らかになった。さらに、本活性物質が病原菌の生体制御に関わる遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学合成農薬は植物病原菌の様々な部位に直接作用し、殺菌することで防除に貢献する。しかし、耐性菌の出現が問題であった。本研究では、植物病原菌の生体制御に関わる遺伝子に作用する微生物の2次代謝産物の生産方法と植物病原菌に対する作用機構の一部を明らかにできた。これらの結果は、遺伝子をターゲットした新たな作用的を示す農薬の開発に寄与できることを示した。今後、本物質が農薬として利用することができれば、農作物の安定的な生産に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was clarified that the secondary metabolites of microorganisms preserved in the Okinawa microbial library can suppress the outbreak of the disease by acting on the appressorium of the rice blast fungus and infection site of other plant pathogenic fungi. In addition, it was clarified that the active substances contained in the secondary metabolites of microorganisms can be produced by several Streptomyces sp.. Also, it was high molecular weight substances that were stable against heat and acid. Furthermore, it was shown that this active substance may affect the expression of genes involved in the bioregulation of plant pathogenic fungus.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病害防除 二次代謝産物 イネ いもち病

1. 研究開始当初の背景

現在、急激な地球温暖化に伴い、想定外の異常気象や新たな病害虫が発生し、農作物生産の安定供給に大きな影響を与えている。また、世界的な人口増加により、食料不足を招くことが予想されている。これらの問題は世界規模で発生しているが、とりわけ、途上国では深刻であり、対策が必要となる。農作物生産における病害虫による被害は、世界で 3500 億ドル以上と推定されており、病原菌による被害だけでも 8 億人分の食料に相当すると言われている。植物病原菌による農作物への被害を減らすことは食料の安定供給に重要となる。農作物生産の安定供給に必要な不可欠な資材として、農薬（化学合成農薬）がある。しかし、農薬に対する薬剤耐性菌が出現して以来、現在でも薬剤耐性菌の出現が問題となっている。特にイネいもち病では、メラニン合成阻害剤（MBI-D/MBI-R）や QoI 剤に対する薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっている。近年では、微生物農薬も開発されてきているが、化学合成農薬と比較すると種類や安定性などの問題も多い。これらの問題解決のためには、新たな農薬の元となる物質や微生物農薬の候補となる微生物の探索の探索が必要となる。新たな農薬の元となる物質の探索には微生物が生産する 2 次代謝産物が考えられる。微生物は同じ属や種であっても環境や培養条件により、生産する代謝産物が異なる場合がある。そこで、申請者は、国内の研究所及び大学に保存されている微生物に注目した。琉球大学熱帯生物圏研究センターとトロピカルテクノセンターにより開発された『沖縄微生物ライブラリー』には、亜熱帯地域である沖縄県内の島々で採取された植物及び土壌から分離された様々な微生物種が保存されており、機能性評価が行われたが、これまでに植物病原菌に対する機能性評価は行われていなかった。

申請者は、イネの重要病害であるイネいもち病菌を材料として、『沖縄微生物ライブラリー』に保存されている菌体抽出液のスクリーニングを開始した。その結果、抗菌活性を示す複数の菌体抽出液が存在することが明らかになり、沖縄微生物ライブラリーの有用性が示された（Ueno et al. 2016）。1839 菌株のスクリーニングでは抗菌活性とは、異なる活性を示す菌体抽出液が存在した。それは、イネいもち病菌の付着器の異常な拡大させつつ、メラニン合成を抑制する菌体抽出液の存在である（Tamura et al. 2019）。通常、イネいもち病菌は、分生子が発芽し、発芽管を伸ばした先に 10 μ m 程度の付着器を形成し、付着器にメラニンが合成されることで、宿主であるイネに侵入できる。しかし、沖縄微生物ライブラリーに保存されている 3-45 菌株の菌体抽出液の中には、その付着器を異常に拡大(30-40 μ m)させつつ、侵入に不可欠なメラニン合成を抑制する作用を示す物質が存在することを明らかにした。これらの結果から本菌体抽出液が付着器形成やメラニン合成に関わるのではないかとする仮説が立てられた。例えば、本物質が遺伝子レベルで発現を制御する作用を示すのであれば、これまではない、遺伝子をターゲットした新たな農薬の開発に寄与できると考えられる。一方、物質レベルで制御しているのであれば、これまではない新たな作用点としての農薬の開発に寄与できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、下記の方法により、*Streptomyces erythrochromogenes*(3-45 菌株)を用いて、『菌体抽出液中の活性物質がイネいもち病菌の感染行動関連遺伝子に与える影響の発現解析』と共に『菌体抽出液に含まれる活性物質の構造解析』を行う。これにより、本研究で活性物質の構造と作用機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 菌体抽出液中の活性物質がイネいもち病菌の感染行動関連遺伝子の発現に及ぼす影響

3-45 菌株の菌体抽出液は右図のように 6 時間後にはイネいもち病菌の付着器に影響を与え、24 時間後には、コントロールと比較して、異常に拡大した付着器を形成しつつ、メラニン合成を抑制する。そこでイネいもち病菌の発芽から付着器形成に関連する遺伝子の網羅的な発現解析のために、イネいもち病菌の分生子をプラスチックバットに流し込み、24 時間に mRNA の抽出及び cDNA の合成を行い、次世代シーケンサー-MiSeq による発現解析を行う。特に発現が増減している遺伝子に注目して、リアルタイム PCR による発現解析を行い、本活性物質の作用機構を明らかにする。



(2) 3-45 菌株の菌体抽出液に含まれる活性物質の構造解析

3-45 菌株の菌体抽出液に含まれる活性物質の構造解析を行うために、活性物質の単離を行う。単離には、カラムクロマトグラフを用いる。分画後の物質は、イネいもち病菌の付着器の大きさ及びメラニン化の抑制で確認する。単離後の分子量解析には、GC/MS を用いる。構造解析には、NMR を使用する。

4. 研究成果

(1) 菌体抽出液中の活性物質がイネいもち病菌の感染行動関連遺伝子の発現に及ぼす影響

沖縄微生物ライブラリーに保存されている *Streptomyces erythrochromogenes* と高い相同性を示す 3-45 菌株は、特殊な培養法（富栄養条件での培養後に貧栄養条件で培養する）により、細胞内にイネいもち病菌の付着器の異常な拡大の誘導及び付着器のメラニン化を抑制する物質を生産し、イネ植物体上でもイネいもち病菌の発病を抑制する。同様の活性を示す物質の生産は、沖縄微生物ライブラリーの微生物である 1-86、2-78、2-85、3-38、4-27、20-72 及び 20-86 菌株でも確認され、いずれも *Streptomyces* 属菌であった。4-27 菌株に注目して研究を行った結果、4-27 菌株でも富栄養条件での培養後に貧栄養条件で培養することにより、イネいもち病菌の付着器の異常な拡大の誘導及び付着器のメラニン化を抑制する物質が細胞内で生産された。また、4-27 菌株は *Streptomyces levis* と高い相同性を示し、3-45 菌株とは異なる種であった。そこで、イネいもち病菌の胞子と 4-27 菌株の菌体抽出液を混合し、24 時間後に RNA を抽出し、ライブラリーを作製後に、次世代シーケンサーを用いて、菌体抽出液あり及びなしにおけるイネいもち病菌の遺伝子発現解析を行った。その結果、対照区と比較して、5 倍以上の発現が確認された遺伝子は 222 遺伝子であり、対照区と比較して、1/5 以下の発現が確認された遺伝子は 132 遺伝子であった。多くの遺伝子が Uncharacterized protein であった。また、メラニン合成に関与することが知られている Polyketide synthase 遺伝子の発現は菌体抽出液の処理区で 1/9 以下に低下していた。そこで、リアルタイム PCR を用いて、遺伝子発現を調査した結果、メラニン合成に関わるシタロン脱水酵素遺伝子の発現は 1/2 程度に低下し、1,3,8-THN 還元酵素遺伝子の発現も 1/10 程度まで低下した。遺伝子発現の結果は、3-45 菌株及び 4-27 菌株と同様であった。これらの結果は、3-45 菌株及び 4-27 菌株は *Streptomyces* 属菌の異なる種であるが、特殊な培養条件により菌体内にイネいもち病菌の付着器に影響を与える物質をいずれも生産できることが明らかになった。その他、次世代シーケンサーを用いた解析では、菌体抽出液の処理により、twin-arginine translocation pathway signal 遺伝子、benomyl/methotrexate resistance protein 遺伝子などの遺伝子発現も対照区と比較して、低下していた。

3-45 菌株を用いて、拡大した付着器を透過型電子顕微鏡で観察した結果、付着器内の液胞が拡大し、細胞内の物質が細胞壁周辺に集積していることが明らかになった。さらに菌体抽出液を他の植物病原系状菌に処理した結果、イネいもち病菌と同様に付着器を形成するキュウリ炭疽病菌でも、付着器の異常な拡大と付着器のメラニン合成の抑制が観察された。

一方、侵入部位に明確な付着器を形成しないイネごま葉枯病菌やキュウリ褐斑病菌でも侵入部位の拡大が観察された。いずれの植物病原菌においても菌体抽出液の存在により植物体での発病が抑制された。これらの結果は、本物質が、付着器形成に関与する遺伝子の上流部分に作用している可能性を示したが、どの遺伝子に作用しているのかは明らかにすることができなかった。今後、詳しい遺伝子解析を進める必要がある。

加えて、イネいもち病菌の付着器の異常な拡大の誘導及び付着器のメラニン化を抑制することが明らかになっていた 1-86 菌株についても詳しい調査を行った結果、1-86 菌株は、3-45 菌株及び 4-27 菌株と異なり、貧栄養条件での培養なしに、富栄養条件のみで、菌体内に本物質を生産することが明らかになった。1-86 菌株の種は同定できなかったが、*Streptomyces* 属菌であり、3-45 菌株及び 4-27 菌株と同様の活性を示したことから、本物質が *Streptomyces* 属菌の生存に必要な物質である可能性も考えられた。今後、*Streptomyces* 属菌における本物質の役割も詳しく調査する必要がある。

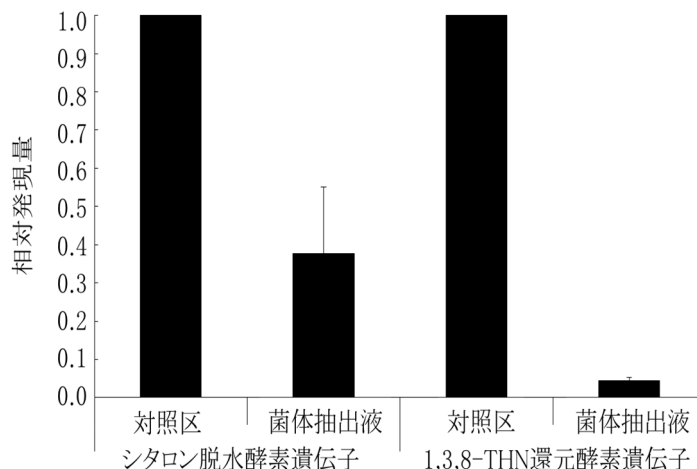


図 菌体抽出液を処理したイネいもち病菌の遺伝子発現

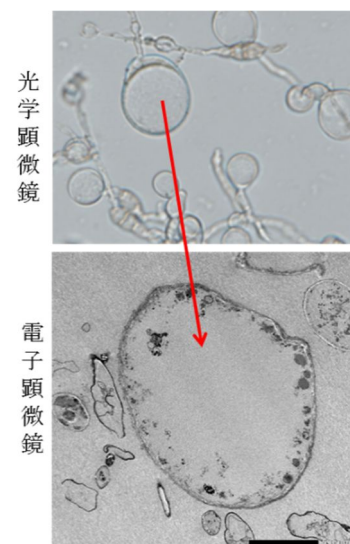


図 菌体抽出液により拡大したイネいもち病菌の付着器

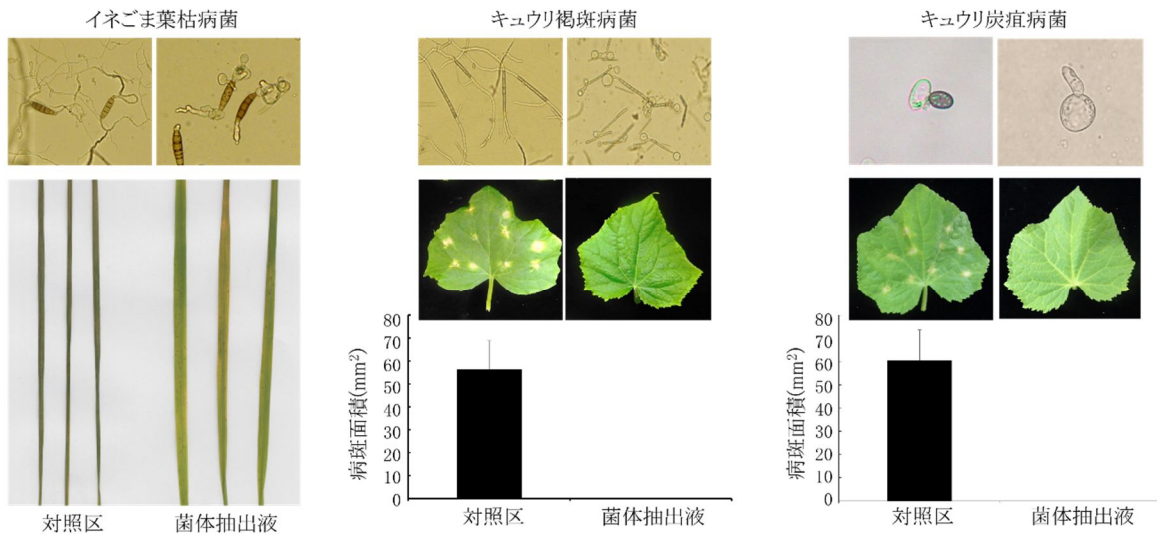


図 菌体抽出液が他の植物病原糸状菌の胞子及び病斑形成に与える影響

(2) 3-45 菌株の菌体抽出液に含まれる活性物質の構造解析

イネいもち病菌の付着器の異常な拡大の誘導及び付着器のメラニン化を抑制する活性物質を明らかにするために、性状解析と単離を行った。

まず、単離を行うために、活性物質の性状解析を行った。その結果、細胞内に蓄積する活性物質は、30-70%アセトン抽出により抽出され、50%アセトン抽出が効率的であった。また、活性物質は、酢酸エチルに不溶な水溶性の物質であり、熱(121℃、20分間)及び酸処理にも安定であった。さらに限外ろ過では、分子量5万以上10万以下に活性が確認された。これらの性状は、3-45、4-27及び1-86菌株で共通であった。これらの結果から異なる *Streptomyces* 属菌の種が同様の活性を示す物質を細胞内に蓄積できることが示された。C18カラムを用いた分離では、50%アセトニトリルでの溶出が確認された。次にシリカゲル薄層クロマトグラフィーを用いた分離では、イソプロパノール：アンモニア水：水=9：1：2(v/v/v)で展開した結果、Rf値0.25-0.50に活性物質が確認された。一方、GC/MS及びNMRによる解析では、分子量の推定及び構造の決定には至らなかった。今後、大量培養により、解析に使用する活性物質を増やすことにより、分子量の推定と構造決定を進めることが可能になると考えられる。

本研究により沖縄微生物ライブラリーに保存されている *Streptomyces* 属菌が菌体内に生産する高分子の熱安定な水溶性物質はイネいもち病菌等の植物病原菌の侵入部位に影響を与えることが明らかになり、それには付着器又は侵入部位に関わる植物病原菌の遺伝子発現に作用している可能性が示された。今後、作用点を明らかにすることにより、植物病原菌の遺伝子をターゲットとした農薬の開発に寄与できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Kamada Ibuki, Ino Masatoshi, Kihara Junichi, Ito Michihiro, Shinzato Naoya, Ueno Makoto.	4. 巻 27
2. 論文標題 Secondary metabolites produced by actinomycetes affect appressorium formation and melanin synthesis of <i>Pyricularia oryzae</i> causing rice blast disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University.	6. 最初と最後の頁 11-17
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 無
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5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 釜田いぶき・井野真稔・木原淳一・新里尚也・伊藤通浩・上野誠
2. 発表標題 イネいもち病菌の付着器形成に影響を与える微生物の2次代謝産物について
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野誠・新里尚也・伊藤通浩
2. 発表標題 沖縄微生物ライブラリーを活用した植物病害防除の可能性
3. 学会等名 日本植物病理学会 バイオコントロール研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山祐一郎・木原淳一・上野 誠
2. 発表標題 島根微生物ライブラリーを利用したイネいもち病の抑制について（3）
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野誠・田村朋子・権藤由理・Ganphung Rattrikorn・新里尚也・伊藤通浩
2. 発表標題 沖縄微生物ライブラリーを利用した植物病原糸状菌の抑制(2)
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野誠・井野真稔・釜田いぶき・新里尚也・伊藤通浩
2. 発表標題 沖縄微生物ライブラリーを利用した植物病原糸状菌の抑制(4)
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学生物資源科学部 植物病理学研究室 病害抵抗性解明グループ https://www.ipc.shimane-u.ac.jp/blast/index.html

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
研究協力者	新里 尚也 (Shinzato Naoya)		

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
---------	---------