

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22300

研究課題名（和文）植物性乳酸菌の自然界における動態解析と乳酸菌定着植物での病害抑制現象の基盤解明

研究課題名（英文）Analysis of the dynamics of plant lactic acid bacteria in nature and elucidation of the basis of disease suppression phenomenon in plants colonized by lactic acid bacteria

研究代表者

高橋 英樹（Takahashi, Hideki）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：20197164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物性乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*)は動物の自然免疫システムを活性化させて、ヒトや家畜の健康に寄与することが知られている。本研究では、家畜の腸管から単離された植物性乳酸菌の植物病害の対する抑制効果を明らかにすることを目的とした。ブタ腸管および牧草サイレージから単離された植物性乳酸菌を、トマト苗の茎葉に噴霧処理したのち、同苗の根にトマト青枯病細菌を接種したところ、青枯病徴の発生が顕著に抑制された。トマト植物体での植物性乳酸菌と青枯病細菌の分布は明らかに異なるため、根部の植物性乳酸菌が植物免疫システムを活性化させることにより、植物の病害抵抗性を誘導する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物性乳酸菌は免疫システムを活性化させて、ヒトや家畜の健康に寄与することが知られている。また、植物の茎葉には植物性乳酸菌が定着しているが、植物性乳酸菌の植物への役割についての研究は不十分である。本研究では植物性乳酸菌を植物に施用して病害抑制効果を評価することにより、自然界における植物性乳酸菌の動態と植物や動物との関係の包括的理解しようとした。研究の結果、ブタ腸管から単離された植物性乳酸菌は、トマト青枯病の発病抑制効果を持つことが明らかになった。このことは、乳酸菌を生態系の構成因子として捉え、植物・動物との関わりについての包括的理解に繋がる。さらに乳酸菌の植物病害防除資材として利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：It is known that plant lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum*) activate the innate immune system of animals, contributing to the health of humans and livestock. In this study, we aimed to clarify the inhibitory effect of plant lactic acid bacteria isolated from the intestines of livestock against plant diseases. When plant lactic acid bacteria isolated from pig intestines and grass silage were sprayed onto the stems and leaves of tomato seedlings, and the roots of the seedlings were then inoculated with the tomato wilt bacteria, the occurrence of bacterial wilt symptoms was significantly suppressed. Since the distribution of plant lactic acid bacteria and the bacterial wilt bacteria in tomato plants is clearly different, it was thought that the plant lactic acid bacteria in the roots may induce disease resistance in plants by activating the plant immune system.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物性乳酸菌 環境微生物 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

自然界には様々な微生物が生息している。それらの微生物は、生命圏における物質循環に重要な役割を果たしていることが、広く知られている。個々の微生物に注目すると、ある微生物は土壌中に含まれる窒素・炭素化合物を餌として増殖し、またある微生物は、動植物に共生あるいは寄生することにより増殖し、感染して病気を引き起こすこともある。これまで、これらの微生物に関する研究は、その微生物が単離された環境や宿主に焦点を当て研究が行われてきた(例えば土壌微生物であれば、土壌中での微生物の生態や機能に関する研究、家畜の病原菌であれば病原性の分子機構の研究)。一方、特定の微生物をモデルとし、その微生物が環境中をどのように循環し、出会った植物や動物とどのような関係を成立させてきたのかを明らかにする研究は新規性が高く、生態系における微生物の役割を理解する上で、大きなインパクトを与えると考える。

2. 研究の目的

植物性乳酸菌は動物の自然免疫システムを活性化させて、ヒトや家畜の健康に寄与することが知られている。しかし、その植物性乳酸菌の由来については十分な理解がなされていない。また、植物の茎葉には、植物性乳酸菌が定着しているが、自然界における植物性乳酸菌の植物における役割についての研究は不十分である。今回の申請研究は、植物性乳酸菌の環境中における循環と、植物における役割の一つとして病害抑制効果を評価することにより、自然界における植物性乳酸菌の動態と、植物や動物との関係の包括的理解しようとするチャレンジングな研究である。これまでの微生物に関する研究は、その微生物が単離された環境や宿主に焦点を当て行われてきた(例えば土壌微生物であれば、土壌中での微生物の生態や機能に関する研究、家畜の病原菌であれば病原性の分子機構の研究)。また、環境中から単離した微生物を選抜、育種し、産業的に利用(農業用微生物資材、食品産業への利用など)する研究もなされてきた。それらに対して、本申請研究では、乳酸菌を生態系の構成因子として捉え、植物・動物との関わりを包括的に研究しようとする点に重要な意義が存在する。

3. 研究の方法

(1) ブタ腸管より単離した植物性乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) 2 株 (4n4-338, 4n4-326) とサイレージから単離した植物性乳酸菌 (*L. plantarum*) 3 菌株 (MAFF117314, MAFF516273, MAFF516241) を、MRS 寒天培地を用いて嫌氣的に培養した。得られたコロニーを MRS 液体培地に移植し、28℃で一晩静置培養した。培養液を遠心分離により集菌後、沈澱した菌体を滅菌蒸留水に懸濁し、菌濃度 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells/ml に調整した。

(2) 3 葉期のトマト苗 (品種 桃太郎) を 1×10^3 cells/ml の青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) を含む畑土壌に移植し、個体あたり 20ml の植物性乳酸菌懸濁液を茎葉に噴霧処理した。1 試験区あたり 6~9 個体のトマト苗を用いた。

(3) 植物体を 30℃のクロスチャンバーで 10 日間栽培し、青枯病の発病を Disease score (発病個体の割合) および以下の式により算出した Disease score index (DSI) により評価した。

$DSI = ([1A + 2B + 3C] / 3N) \times 100$ [A: Chlorosis (黄化) を呈した個体数, B: Partial wilt (部分的な萎凋症状) を呈した個体数, C: Wilt (萎凋症状) を呈した個体数]

4. 研究成果

(1) 植物性乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) 2 株 (4n4-338, 4n4-326) とサイレージから単離した植物性乳酸菌 (*L. plantarum*) 3 菌株 (MAFF117314, MAFF516273, MAFF516241) を、それぞれ菌濃度 1×10^7 cells/ml でトマト苗 (青枯病菌汚染土壌に移植したトマト苗) に処理したところ、MAFF117314, MAFF516273, MAFF516241 処理区では、顕著な青枯病発病抑制が認められた (図 1)。同時に、コントロールとして滅菌蒸留水を処理した試験区では、顕著な青枯症状が見られたことから (図 1)。

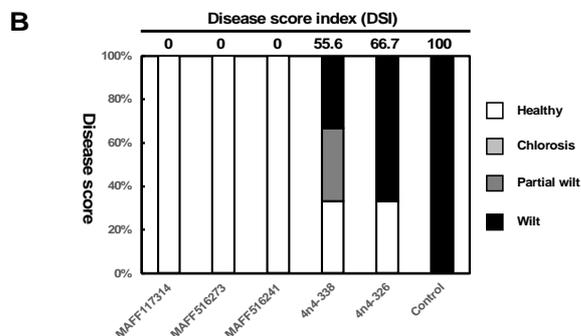
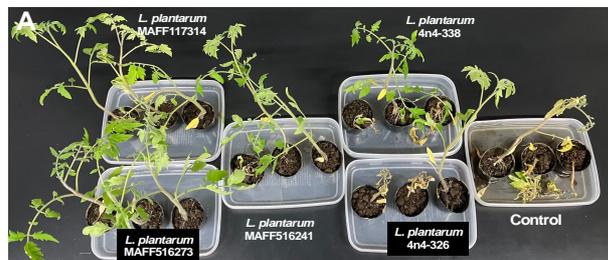


図1 植物性乳酸菌の施用によるトマト青枯病の抑制評価
A. 植物性乳酸菌5株を地上部の噴霧後、青枯病菌汚染土壌に定植し、栽培10日後の植物体。B. 植物性乳酸菌施用トマトにおける青枯病発病評価。

サイレージから単離された植物性乳酸菌 3 株には、青枯病菌による青枯病の発病を抑制する効果があると考えられた。また、ブタ腸管より単離した植物性乳酸菌 2 株を処理した試験区では、中程度の青枯病抑制効果が認められた (図 1)。

(2) ブタ腸管より単離した植物性乳酸菌 2 株を、菌濃度 1×10^7 cells/ml でトマト苗に処理した試験区では青枯病抑制効果が中程度であったことから、同 2 菌株の菌濃度を 1×10^8 cells/ml に調整し、同様にトマト苗 (青枯病菌汚染土壌に移植したトマト苗) に処理したところ、コントロール区では顕著な青枯症状が認められたのに対して、2 菌株処理区では、いずれも青枯症状が有意に抑制された (図 2)。これらの結果から、試験に用いた植物性乳酸菌 5 株は、ブタ腸管 (= 動物) 由来か、サイレージ (= 植物) 由来かにかかわらず、青枯菌感染による発病を抑制する活性を有しているものと考えられた。

青枯病菌は、土壌生息性の病原細菌であり、トマトの根部に生じた傷口から侵入し、細胞間隙で増殖して導管組織に侵入する。導管で増殖した青枯病菌が分泌する菌体外多糖類が導管を閉塞させ、植物体地上部への水の通水が阻害されることにより萎凋症状が発生する。一方、植物性乳酸菌は鞭毛を持たないことから、茎葉に散布された植物性乳酸菌が鞭毛による運動能により、気孔から植物体内 (特に導管組織) に侵入することは考えにくい。また、青枯病菌が根部から侵入し、主根から茎組織の導管を徐々に地上部方向に移行するのに対して、葉面散布された植物性乳酸菌は、葉表面に留まる可能性が高い。したがって、青枯病菌と植物性乳酸菌の直接的な接触は考えられず、むしろ植物体が植物性乳酸菌を異物として認識することにより、植物免疫システムが活性化され、その結果、植物の青枯病菌の侵入・増殖が抑制されることにより、青枯病の発病が抑制された可能性が高いと推察した。さらに、この発病抑制作用は、ブタ腸管由来の植物性乳酸菌でも、サイレージ由来の植物性乳酸菌でも認められたことから、「植物に生息する植物性乳酸菌 動物による植物の摂食 植物性乳酸菌の動物腸管への定着 動物の排泄物を介した植物性乳酸菌の環境中への放出 環境中に放出された植物性乳酸菌の植物への定着」のように植物性乳酸菌が環境中で循環を繰り返す過程の中で、植物の病原体に対する感染防御に関わっている可能性を得ることができた。今後、本実験で用いた植物性乳酸菌 5 株と処理したトマト植物体において、植物免疫関連遺伝子の発現上昇を解析することにより、環境中における植物性乳酸菌の存在意義の解明と、植物病害資材としての利用の可能性についてさらに研究を進める端緒を得ることができた。

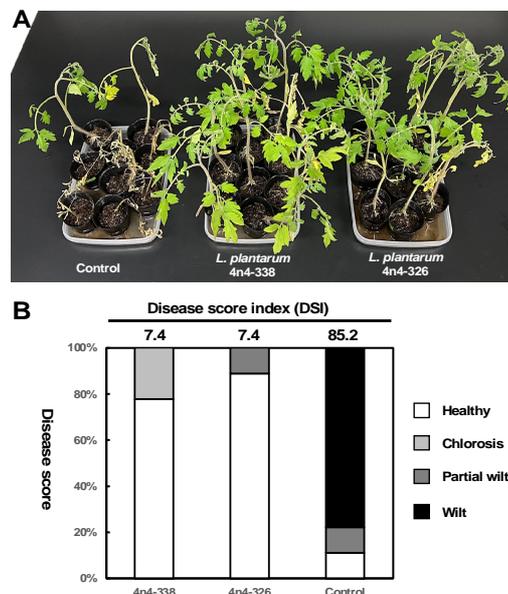


図2 植物性乳酸菌の施用によるトマト青枯病の抑制評価
A. 植物性乳酸菌2株を地上部の噴霧後、青枯病菌汚染土壌に定植し、栽培10日後の植物体。B. 植物性乳酸菌施用トマトにおける青枯病発病評価。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kanaizuka, A., Sasaki, R., Miyashita, S., Ando, S., Kumiko Ito, K., Fukuhara, T. and Takahashi, H.	4. 巻 89
2. 論文標題 Isolation of Burkholderia jumbo phages and their utilization as biocontrol agents to suppress rice seedling rot disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 24-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-022-01107-z	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 Sasaki Ryota, Miyashita Shuhei, Ando Sugihiko, Ito Kumiko, Fukuhara Toshiyuki, Takahashi Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Isolation and Characterization of a Novel Jumbo Phage from Leaf Litter Compost and Its Suppressive Effect on Rice Seedling Rot Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 591 ~ 591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13040591	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 -
1. 著者名 Indo Y, Kitahara S, Tomokiyo M, Araki S, Islam MA, Zhou B, Albarracin L, Miyazaki A, IkedaOhtsubo W, Nochi T, Takenouchi T, Uenishi H, Aso H, Takahashi H, Kurata S, Villena J and Kitazawa H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Ligilactobacillus salivarius strains isolated from the porcine gut modulate innate immune responses in epithelial cells and improve protection against intestinal viral-bacterial superinfection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 652923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.652923	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 Leonardo Albarracin, Valeria Garcia-Castillo, Yuki Masumizu, Yuhki Indo, Md Aminul Islam, Yoshihito Suda, Apolinaria Garcia-Cancino, Hisashi Aso, Hideki Takahashi, Haruki Kitazawa and Julio Villena	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient selection of new immunobiotic strains with antiviral effects in local and distal mucosal sites by using porcine intestinal epitheliocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00543	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 Mizuno H, Tomotsune K, Islam MA, Funabashi R, Albarracin L, Ikeda-Ohtsubo W, Aso H, Takahashi H, Kimura K, Villena J, Sasaki Y and Kitazawa H	4. 巻 11
2. 論文標題 Exopolysaccharides from <i>Streptococcus thermophilus</i> ST538 modulate the antiviral innate immune response in porcine intestinal epitheliocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00894	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 Hiroya Mizuno, Lorena Arce, Kae Tomotsune, Leonardo Albarracin, Ryutaro Funabashi, Daniela Vera, Md. Aminul Islam, Maria Guadalupe Vizoso-Pinto, Hideki Takahashi, Yasuko Sasaki, Haruki Kitazawa and Julio Villena	4. 巻 11
2. 論文標題 Lipoteichoic acid is involved in the ability of the immunobiotic strain <i>Lactobacillus plantarum</i> CRL1506 to modulate the intestinal antiviral innate immunity triggered by TLR3 activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00571	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 Valeria Garcia-Castillo, Guillermo Marcial, Leonardo Albarracin, Mikado Tomokiyo, Patricia Clua, Hideki Takahashi, Haruki Kitazawa, Apolinaria Garcia-Cancino and Julio Villena	4. 巻 8
2. 論文標題 The exopolysaccharide of <i>Lactobacillus fermentum</i> UC0-979C is partially involved in its immunomodulatory effect and its ability to improve the resistance against <i>Helicobacter pylori</i> infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8040479	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 Tada, A., Kober, A.H., Islam, M.A., Igata, M., Takagi, M., Suzuki, M., Aso, H., Ikeda-Ohtsubo, W., Yoda, K., Miyazawa, K., He, F., Takahashi, H., Villena, J. and Kitazawa, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of fat accumulation and adipokine production during the long-term adipogenic differentiation of porcine intramuscular preadipocytes and study of the influence of immunobiotics.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071715	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 Albarracin L., Komatsu R., Garcia-Castillo V., Aso H., Iwabuchi N., Xiao J.-Z., Abe F., Takahashi H., Villena J., Kitazawa H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Deciphering the influence of paraimmunobiotic bifidobacteria on the innate antiviral immune response of bovine intestinal epitheliocytes by transcriptomic analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Beneficial Microbes	6. 最初と最後の頁 199 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3920/BM2018.0024	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 該当する

1. 著者名 Igata Manami, Islam Md. Aminul, Tada Asuka, Takagi Michihiro, Kober A. K. M. Humayun, Albarracin Leonardo, Aso Hisashi, Ikeda-Ohtsubo Wakako, Miyazawa Kenji, Yoda Kazutoyo, He Fang, Takahashi Hideki, Villena Julio, Kitazawa Haruki	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcriptome Modifications in Porcine Adipocytes via Toll-Like Receptors Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 Article 1180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01180	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 Yariyama S., Ando S., Seo S., Nakaho K., Miyashita S., Kanayama Y., Takahashi H.	4. 巻 68
2. 論文標題 Exogenous application of L histidine suppresses bacterial diseases and enhances ethylene production in rice seedlings	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppa.13037	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 Garcia-Castillo Valeria, Komatsu Ryoya, Clua Patricia, Indo Yuhki, Takagi Michihiro, Salva Susana, Islam Md. Aminul, Alvarez Susana, Takahashi Hideki, Garcia-Cancino Apolinaria, Kitazawa Haruki, Villena Julio	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the Immunomodulatory Activities of the Probiotic Strain <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 Article 1376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01376	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 阿部香奈, 佐々木稜太, 金井塚綾音, 宮下脩平, 安藤杉尋, 高橋英樹
2. 発表標題 イネもみ枯細菌病菌に感染する新奇 Siphoviridae科ファージの性状解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木稜太, 宮下脩平, 安藤杉尋, 高橋英樹
2. 発表標題 Ralstonia属細菌に感染するファージ群の落葉堆肥からの検出とその解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部香奈, 佐々木稜太, 宮下脩平, 高橋英樹
2. 発表標題 ナス科植物青枯病菌の保有するプロファージの誘発条件の検討と溶菌化プロファージの性状解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金井塚文音・佐々木稜太・宮下脩平・安藤杉尋・高橋英樹
2. 発表標題 Burkholderia 属細菌に感染する新奇ファージの遺伝子構造解析と病害防除利用への検討
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金井塚文音・佐々木稜太・宮下脩平・安藤杉尋・高橋英樹
2. 発表標題 イネもみ枯細菌病菌に感染するバクテリオファージの病害抑制効果および保存法の検討
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木稜太・三富直人・宮下脩平・安藤杉尋・高橋英樹
2. 発表標題 有機栽培育苗土からのイネもみ枯細菌病菌に感染するファージの探索と特性解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三富直人・宮下脩平・高橋英樹・安藤杉尋
2. 発表標題 有機栽培育苗土から作出したイネもみ枯細菌病抑制効果を持つ細菌集団の施用によるイネ内生菌叢への影響
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2019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	北澤 春樹 (KITAZAWA Haruki) (10204885)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	

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