

令和 5 年 5 月 5 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05812

研究課題名（和文）微生物と植物の細胞間相互作用に着目した植物免疫活性化微生物および化合物の探索

研究課題名（英文）Search for plant immunity-activating microorganisms and compounds based on plant-microbe cell-cell interactions

研究代表者

古屋 俊樹（Furuya, Toshiki）

東京理科大学・創域理工学部生命生物科学科・准教授

研究者番号：20367064

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）：植物の免疫を活性化する微生物は、微生物農薬としての利用に期待が寄せられている。しかしながら、微生物の植物免疫活性化能を評価する簡便な手法がなく、当該微生物のスクリーニングに多くの時間と労力を要しているのが現状である。そこで本研究では、微生物と植物培養細胞の相互作用に着目した植物免疫活性化能の評価手法を開発した。さらに、コマツナとダイコンの内部から細菌を分離し、開発した評価手法に供した。その結果、一部の細菌は植物培養細胞の免疫応答を亢進し、実際にこれらの細菌を植物に接種することにより、植物に耐病性を付与できることを明らかにした。植物免疫活性化内生菌が有する植物免疫活性化成分についても解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物の植物免疫活性化能を評価することは一般に困難だが、本研究では植物培養細胞を利用した簡便な評価手法を開発することができた。この評価手法を利用して取得された細菌は、実際に植物に耐病性を付与できることも確認しており、微生物農薬の利用や普及に貢献できる技術であると考えている。また、植物免疫活性化内生菌が有する植物免疫活性化成分についても解析し、内生菌は属種により異なる植物免疫活性化機構を有していることが示唆された。これらの植物免疫活性化成分についても農業に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Microorganisms that activate plant immune responses have high potential for application as biocontrol agents in agriculture to minimize crop losses. However, conventional methods to screen for plant immunity-activating bacteria are cumbersome and tend to be laborious and time consuming. In this study, we established a method using cultured plant cells to directly detect microorganisms that activate the plant immune system based on plant-microbe interactions. Furthermore, bacteria were isolated from the inside of *Brassica rapa* var. *perviridis* and *Raphanus sativus* var. *hortensis* and subjected to the established method. Some bacteria enhanced the immune response of cultured plant cells, and inoculation of these bacteria into plants actually conferred disease resistance to plants. We also examined the components involved in plant immune activation produced by these endophytic bacteria.

研究分野：応用生物化学

キーワード：植物免疫活性化微生物 内生菌 微生物農薬 植物培養細胞 活性酸素種 細胞間相互作用 アブラナ科植物 植物病原菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、環境保全型農業の実現に向けて、植物の免疫を高める植物免疫活性化剤が注目されている。従来の殺菌剤は標的とする植物病原菌に対して的確に効果を発揮するが、薬剤耐性菌の増加や、植物に必要な微生物までも殺して土壌の劣化を招くことが危惧されている。これに対して、植物免疫活性化剤はワクチンのように植物自身の免疫を高め、これにより植物病原菌に対して広く効果を発揮し、その一方で殺菌作用を示さないため、薬剤耐性菌を生じるリスクや微生物生態系を攪乱するリスクがほとんどない。このことから、植物免疫活性化剤は次世代型の農薬として注目されている。植物免疫活性化剤として、化合物に加えて、微生物を利用する手法も有効である。微生物の中には、植物本来の防御能である免疫応答を増強する菌も存在することが知られており、微生物農薬としての利用に関心が寄せられている(化学と生物, 51, 541 (2013); Curr Opin Plant Biol, 11, 443 (2008))。また、微生物農薬といえども、実際に植物に作用しているのは微生物由来の何らかの化合物であり、植物免疫を活性化する微生物は新規化合物の探索源としてもポテンシャルを有する。そこで、植物免疫活性化微生物を効率的に取得可能な探索手法があれば有効である。しかしながら、従来の微生物探索は温室等で育成した植物体を用いた煩雑な菌の接種試験に専ら依存しており、効率的とは言い難い。また、植物体の表現型(耐病性)を指標にしており、作用機序を考慮せず偶発性に頼るところが大きいため、緻密な探索手法とは言い難い。

### 2. 研究の目的

本研究では、微生物と植物の細胞間相互作用を基盤とした、植物免疫を活性化する微生物の新しい評価手法を考案、確立し、免疫活性化剤として効果を発揮する新規微生物および微生物由来化合物を取得することを目的とした。具体的には、まず、植物培養細胞を利用した植物免疫活性化微生物の評価手法を確立した。つぎに、確立した手法を用いてアブラナ科のコマツナおよびダイコンから植物免疫活性化内生菌の取得を試みた。さらに、取得した内生菌が有する植物免疫活性化成分を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 植物培養細胞を利用した植物免疫活性化微生物の評価手法の確立

タバコ培養細胞 BY-2 の懸濁液に微生物を接種後、4 時間振とうした。その後、この時点までに BY-2 細胞や微生物により生成された物質を除去するために、遠心分離して上清を除去した。さらに、BY-2 細胞を緩衝液に再懸濁後、病原性卵菌 *Phytophthora cryptogea* 由来のタンパク質性エリシターであるクリプトゲインを添加し、活性酸素種(ROS)生成を化学発光試薬と発光測定装置で計測した。

#### (2) アブラナ科のコマツナおよびダイコンからの植物免疫活性化内生菌の取得

有機栽培で育てられたアブラナ科のコマツナおよびダイコンから内生菌の分離を試みた。東京都立川市の鈴木農園の協力を得て、有機栽培で育てられたコマツナとダイコンをサンプルとした。表面を次亜塩素酸ナトリウムとエタノールにより殺菌後、内部を固体培地に接触させることにより内生菌の分離を試みた。分離した内生菌を、上述の植物培養細胞を利用した植物免疫活性化微生物の評価手法に供し、当該微生物を選別した。

この一次評価で ROS 生成を顕著に亢進した内生菌に関して、植物体のシロイヌナズナを用いた二次評価を行った。具体的には、7 日間生育させたシロイヌナズナの幼苗の根に内生菌懸濁液を接触させ、さらに 7 日間生育させた。シロイヌナズナに矮化作用を及ぼさなかった内生菌に関して、トマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 と軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* NBRC14082 に対する耐病性を評価した。

#### (3) 取得した内生菌が有する植物免疫活性化成分の解析

コマツナ由来の *Delftia* sp. BR1R-2 株と *Arthrobacter* sp. BR2S-6 株に関して、植物免疫活性化成分を解析した。まず、培養液を遠心分離により菌体と菌体外成分に分画し、上述の手法で ROS 生成亢進活性を評価した。BR1R-2 株では、菌体の方に当該活性が検出されたため、菌体をさらに分画し、吸光スペクトル測定等により植物免疫活性化成分を解析した。一方、BR2S-6 株では、菌体外成分の方にも当該活性が検出されたため、菌体外成分をさらに分画し、LC-MS/MS 分析等により植物免疫活性化成分を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 植物培養細胞を利用した植物免疫活性化微生物の評価手法の確立

タバコの培養細胞 BY-2 は、病原性卵菌 *P. cryptogea* 由来のタンパク質性エリシターであるクリプトゲインを受容すると免疫応答を示すが、ROS の生成量と防御応答の強さに正の相関があることが知られている(Plant Cell Physiol, 45, 160 (2004))。そこで、微生物を BY-2 細胞と試験管内で接触させた後、クリプトゲインを添加して ROS 生成を計測することにより、微生物の植物免疫活性化能を評価できるのではという着想に至った(図 1)。もし微生物が植物免疫活性化能を有していれば、微生物を接触させていないときと比較して、クリプトゲイン添加時の ROS 生成が高まるだろうという原理である。種々の条件を検討し、本評価手法を確立することに成功し

た。ROS 生成の亢進を指標とする本手法を利用すると、微生物が植物免疫を活性化するポテンシャルを有するかどうかを、わずか数時間で判定することができる。

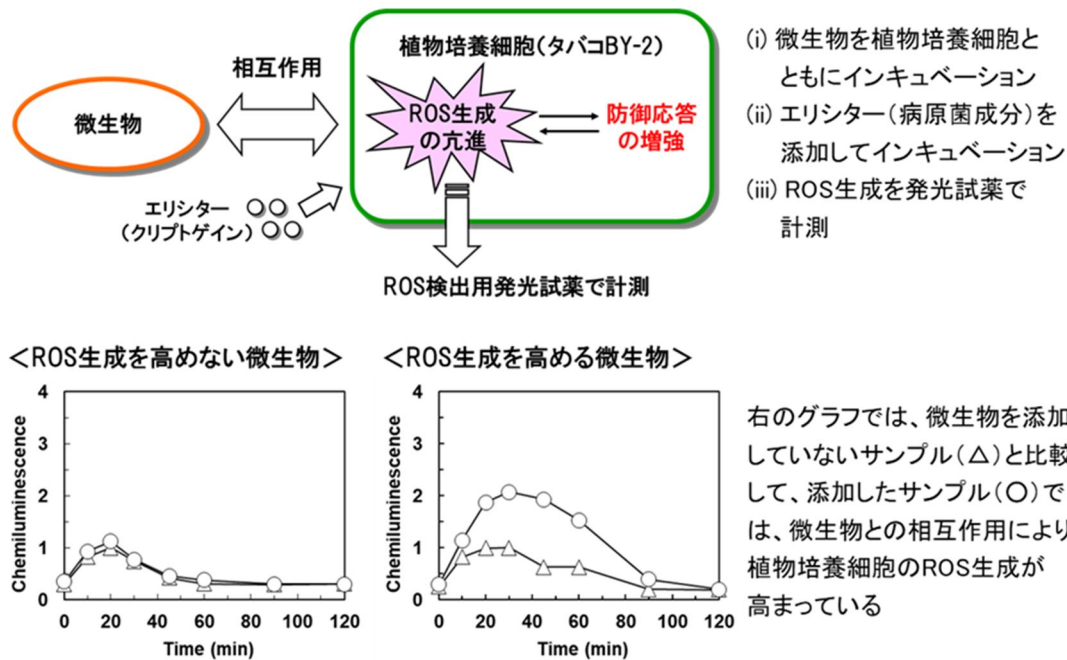


図1 微生物の植物免疫活性化能を評価する新しい手法

## (2) アブラナ科のコマツナおよびダイコンからの植物免疫活性化内生菌の取得

まず、有機栽培で育てられたコマツナから内生菌の分離を試みた。有機栽培では化学農薬を使用せずに、長年の経験を通して植物が病気にかかりにくい栽培手法を確立している。有機栽培で育てられたコマツナの内部には、植物免疫を活性化する微生物が住みついているのではないかと予想した。そこで、東京都立川市の鈴木農園の協力を得て、有機栽培で育てられたコマツナをサンプルとした。内生菌の分離を試みた結果、コマツナから31株の細菌を取得できた。

この分離した31株のコマツナ内生菌を、上述の評価手法に供した。その結果、多くの細菌はBY-2細胞に影響を及ぼさないのに対して、8株の細菌はBY-2細胞のクリプトゲイン誘導性のROS生成を亢進することがわかった。この一次評価で陽性を示した細菌のうち、*Delftia* sp. BR1R-2株と*Arthrobacter* sp. BR2S-6株をモデル植物であるシロイヌナズナの幼苗の根に接触させたところ、シロイヌナズナの生育に影響を与えずに内生した。さらに、内生させたシロイヌナズナにトマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌を感染させたところ、BR1R-2株とBR2S-6株はどちらもシロイヌナズナに両病原菌に対する抵抗性を付与することができた(図2)。シロイヌナズナに感染したトマト斑葉細菌病菌の数を計測したところ、内生させていない対照と比較してBR1R-2株を内生させた場合には0.9%、BR2S-6株を内生させた場合には7.4%まで減少していた。また、遺伝子レベルでの解析も実施し、防御関連遺伝子の発現が高まっていることを確認できた。

同様に、有機栽培で育てられたダイコンから25株の細菌を取得でき、このうち6株はBY-2細胞のクリプトゲイン誘導性のROS生成を亢進した。この一次評価で陽性を示した細菌をシロイヌナズナに内生させ、耐病性試験を実施した。その結果、*Pseudomonas* sp. RS3R-1株はトマト斑葉細菌病菌、*Rhodococcus* sp. RS1R-6は軟腐病菌、*Pseudomonas* sp. RS1P-1株は両病原菌に対する病害抵抗性を向上させた。このように、ダイコンからも植物免疫活性化内生菌を取得することができた。

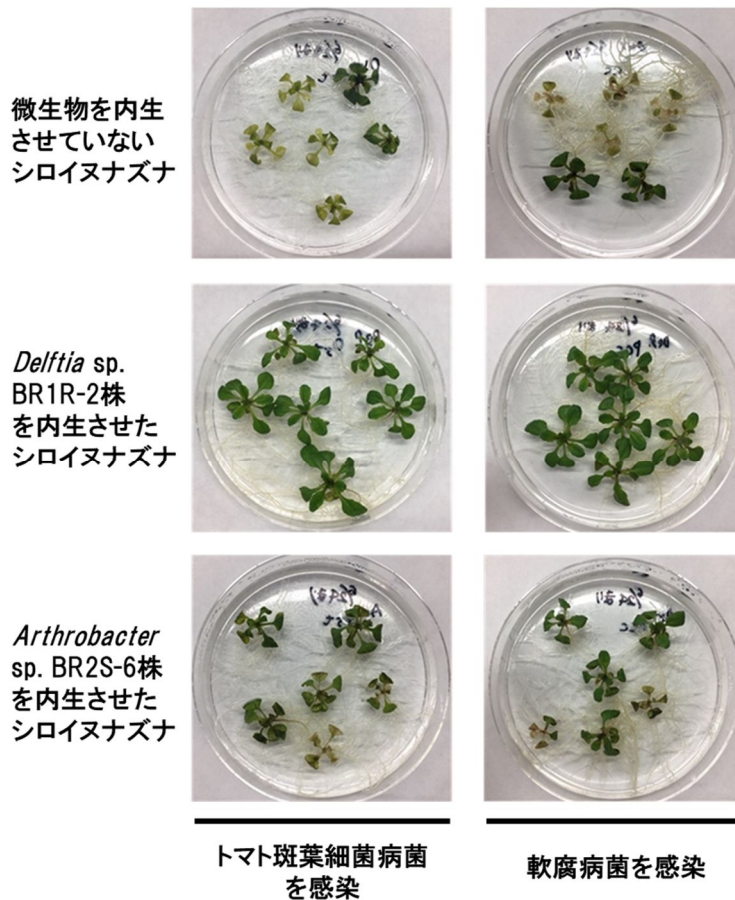


図2 BR1R-2株およびBR2S-6株によるシロイヌナズナへの病害抵抗性の付与  
シロイヌナズナの幼苗の根を内生菌懸濁液に接触させ、7日間育成後、病原菌を接種してさらに3日間育成した。上段はシロイヌナズナがトマト斑葉細菌病菌および軟腐病菌によりダメージを受けているが、中段はBR1R-2株、下段はBR2S-6株を内生させることにより病害抵抗性が付与されている。

### (3) 取得した内生菌が有する植物免疫活性化成分の解析

まず、*Delftia* sp. BR1R-2株の植物免疫活性化成分を解析した。BR1R-2株の培養液を遠心分離により菌体と菌体外成分に分画し、上述の手法でROS生成亢進活性を評価したところ、菌体の方に当該活性が検出された。また、菌体をオートクレーブ処理後に遠心分離に供したところ、当該活性は維持されており、遠心分離後の上清(可溶性画分)に活性が検出された。さらに、オートクレーブ処理後の可溶性画分に含まれる活性成分を限外ろ過、多糖検出試薬、吸光スペクトルにより解析したところ、主要な植物免疫活性化成分は外膜に存在するリポ多糖であることが明らかとなった。

同様に、*Arthrobacter* sp. BR2S-6株の植物免疫活性化成分を解析した。BR2S-6株の培養液を遠心分離により菌体と菌体外成分に分画し、上述の手法でROS生成亢進活性を評価したところ、菌体外成分の方にも当該活性が検出された。さらに、菌体外に存在する活性成分は熱によって失活する高分子化合物であることが明らかとなり、タンパク質である可能性が示唆された。そこで、硫安分画によるタンパク質の精製とLC-MS/MSによるアミノ酸配列解析を行ったところ、興味深いことに植物免疫活性化成分はプロテアーゼ様タンパク質であることが明らかとなった。これより、内生菌は属種により異なる植物免疫活性化機構を有していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 2件）

1. 著者名 Kurokawa M, Nakano M, Kitahata N, Kuchitsu K, Furuya T	4. 巻 11
2. 論文標題 An efficient direct screening system for microorganisms that activate plant immune responses based on plant-microbe interactions using cultured plant cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 7396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86560-0	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 古屋俊樹	4. 巻 420
2. 論文標題 植物の内部で生きる微生物 - 植物内生菌が植物の健康を支える -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 理大 科学フォーラム	6. 最初と最後の頁 14-17
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 -
1. 著者名 古屋俊樹	4. 巻 5
2. 論文標題 植物の免疫システムを活性化する微生物の簡便なスクリーニング手法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 47-50
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 -
1. 著者名 Kaneko H, Furuya T	4. 巻 12
2. 論文標題 Draft genome sequences of endophytic Pseudomonas strains, isolated from the interior of Brassicaceae plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiol. Resour. Announc.	6. 最初と最後の頁 e0133722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01337-22	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 古屋俊樹	4. 巻 6
2. 論文標題 植物免疫活性化内生菌の病害抵抗性亢進および二次代謝誘発への応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 536-539
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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古屋俊樹
2. 発表標題 An efficient screening system for microorganisms that activate plant immune responses
3. 学会等名 Plant Microbiota Research Network (PMRN) 第1回オンラインシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤僚、橋本研志、朽津和幸、古屋俊樹
2. 発表標題 コマツナ内生菌Delftia sp. BR1R-2株の植物免疫活性化成分の解析
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子宏槻、宮田風眞、黒川摩利、橋本研志、朽津和幸、古屋俊樹
2. 発表標題 ダイコンからの植物免疫活性化内生菌の探索
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島脇遼、黒川摩利、中野 正貴、中島 将博、朽津和幸、古屋俊樹
2. 発表標題 コマツナ内生菌Arthrobacter sp. BR2S-6 株の植物免疫を活性化する成分の解析
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原正賢、島脇遼、中島将博、橋本研志、朽津和幸、古屋俊樹
2. 発表標題 コマツナ内生菌Arthrobacter sp. BR2S-6株が細胞外に分泌する植物免疫活性化成分の解析
3. 学会等名 2022年度日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤僚、橋本研志、朽津和幸、古屋俊樹
2. 発表標題 植物免疫活性化内生菌Delftia sp. BR1R-2株の機能解析
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子宏槻、宮田風眞、橋本研志、朽津和幸、古屋俊樹
2. 発表標題 植物の免疫を活性化するダイコン由来内生菌の探索と機能解析
3. 学会等名 2023年度日本農芸化学会大会
4. 発表年 2023年



〔図書〕 計1件

1. 著者名 古屋俊樹（共著）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 バイオスティミュラントハンドブック、第1編7章4節 植物の免疫システムを活性化する微生物の簡便な評価手法の開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物の免疫システムを活性化する微生物の簡便なスクリーニング手法を開発 <a href="https://www.tus.ac.jp/today/archive/20210414_3435.html">https://www.tus.ac.jp/today/archive/20210414_3435.html</a>
---

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	朽津 和幸  (Kuchitsu Kazuyuki)  (50211884)	東京理科大学・創域理工学部生命生物科学科・教授    (32660)	

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