

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05592

研究課題名（和文）植物葉面細菌の6型分泌系を利用した植物細菌病害の防除技術の開発に資する基盤構築

研究課題名（英文）Establishment of a foundation for controlling plant bacterial diseases using the type 6 secretion system of plant foliar bacteria

研究代表者

古谷 綾子（Furutani, Ayako）

茨城大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号：30570270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、植物葉面細菌の6型分泌系を利用した植物細菌病害の防除技術の開発に資する基盤構築を目的とする。有機栽培された健全なアブラナ科植物の葉面から植物病原細菌（アブラナ科黒腐病菌およびアブラナ科黒斑細菌病菌）の増殖を抑制し、それらの細菌による病害を抑制する細菌を選抜した。選抜した細菌のDNA解析により、6型分泌系の構築に関与すると推測される遺伝子群を2組有することを確認した。さらに、それらの変異株を用いた試験により、少なくとも一方の分泌系が病原細菌の増殖抑制において役割を果たすことを示唆する知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物細菌病害の防除は主に銅剤や抗生物質が用いられている。しかし、それらの多用による耐性菌の発生や環境微生物への影響が懸念される。農林水産省が策定した「みどりの食料システム戦略」では、環境負荷の低減と持続的な農業生産の確保のため、2050年までに化学農薬使用量（リスク換算）を50%低減する目標を設定している。本研究により、葉面細菌の6型分泌系という生物機能を利用した植物の細菌病害防除の可能性が示唆された。化学薬剤による防除体系を補助する技術として期待されるが、複雑な生物間相互作用のある農業現場でも植物病害防除に細菌の6型分泌系という生物機能を利用できるかについては今後のさらなる検証が必要である。

研究成果の概要（英文）：The objective of this research is to establish a foundation for controlling plant bacterial diseases using the type 6 secretion system of plant foliar bacteria. Bacteria that inhibit the growth of phytopathogenic bacteria (the causal agent of bacterial black rot and bacterial black spot of Brassica) and suppress disease caused by these bacteria were selected from the leaves of healthy, organically grown Brassica plants. DNA analysis revealed that the bacterium possess two sets of genes that were presumed to be involved in the construction of a type 6 secretion system. Furthermore, analysis using mutant strains of the bacterium showed that at least one of the two secretion systems plays a role in suppressing the growth of the pathogenic bacteria.

研究分野：植物病理学

キーワード：6型分泌系 葉面細菌 植物細菌病 病害防除

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原菌に対する拮抗作用を有することが報告されている微生物は、抗生・溶菌作用や、寄生、養分・微量要素・生息場所の競合、あるいは植物の抵抗性誘導などによって病害抑制効果を示すことが知られている。しかし、現象として確認されている発病抑制効果のより詳細な病原菌への作用機構については、依然として不明な点が多い。

いくつかのグラム陰性細菌において、T6SS が細菌間の接触を介して毒性を有するエフェクタータンパク質を他の細菌細胞に送り込み、競合する細菌を殺すことが明らかにされている。近年、非病原細菌の T6SS の植物細菌病害制御への利用可能性を示唆する報告が欧州の研究グループにより行われた。Bernal ら (2017) はアブラナ科野菜黒腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: Xcc) を *Pseudomonas putida* KT2440 株とともに非宿主である *Nicotiana benthamiana* の細胞間隙内に注入接種するというモデル実験系により、KT2440 株が植物体上で Xcc を殺傷し得ることを実証した。一方で、Xcc はアブラナ科野菜の導管内で特異的に増殖することから、本病原細菌の宿主感染時においても KT2440 株が本病害防除に利用可能であるかまでは検証されていなかった。そこで、アブラナ科黒腐病の新たな防除技術として非病原細菌の T6SS を利用可能かという問いを設定した。

2. 研究の目的

本研究では植物葉面より T6SS を有する非病原性細菌を分離し、分離株の中から T6SS により黒腐病を抑制する菌株の選抜することによって葉面細菌の T6SS を利用した植物細菌病害の新たな防除技術の開発に資する基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 葉面細菌の分離

播種後 22 日のアブラナ科植物の葉を 10 mM MgSO₄ 溶液を入れた三角フラスコに入れ、4 にて 120 rpm で 15 分間振とうし、葉の洗浄液を得た。この洗浄液を段階希釈し、シクロヘキシミドを添加した R2A 寒天培地に塗布し、28 で 2 日間培養することで細菌コロニーを分離した。

(2) アブラナ科黒腐病菌の増殖を抑制する葉面細菌の選抜

本選抜は *in vitro* 試験により行った。まず、Xcc 発光変異株 (海洋細菌 *Vibrio fischeri* 由来の発光遺伝子群 Tn4431 の導入により得られた株で野生株様の病原性を有する) を葉面細菌と R2A 寒天培地上において 28 で一晚混合培養後に、ケミルミイメージングシステムを用いて発光観察を行った。発光がほとんど観察されなかった実験区で共培養した葉面細菌を Xcc の増殖抑制能をもつ菌株候補として選抜した。Xcc 発光変異株はテトラサイクリン耐性であることから、その後、テトラサイクリン耐性に基づいた細菌間競合試験も行った。

(3) 培地上で選抜された葉面細菌による黒腐病の発病抑制効果の検討

植物接種試験には、1/2 × MS 寒天培地が入ったプラントボックスで無菌栽培 2 週間後のハクサイ品種“京都 3 号”を用いた。ハクサイ苗に葉面細菌と Xcc を同時接種、あるいは、葉面細菌を前処理後に、Xcc を接種し、7 日後に発病度調査を行った。葉面細菌および病原細菌の接種は flood inoculation 法により行い、OD₆₆₀=1 に調整した細菌懸濁液を 10 mM MgSO₄、0.02%(v/v) Tween 20 で 100-200 倍に希釈したものをを用いた。

(4) 葉面細菌の同定

外部委託による次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析により行った。また、T6SS をコードすると推定される遺伝子を有することを確認した。

(5) T6SS に依存して Xcc を死滅させる葉面細菌の同定

マーカーエクステンジ法により *tssC* 欠損株を作出した。*tssC* 遺伝子の欠損は PCR 解析およびゲノムサザンプロット解析により確認した。

4. 研究成果

(1) 葉面細菌の分離

有機栽培された 4 種のアブラナ科植物 (ミズナ‘早生水菜’、コマツナ‘夏用黒小松菜’、カラシナ‘レッドからし水菜’、およびルッコラ原種‘セルパチコ’) より葉面細菌を分離した。分離された細菌のコロニーの形や色は分離した植物種によって異なる傾向があり、それぞれの植物より、216、150、144、および 114 株の細菌を分離した。

(2) Xcc の増殖抑制能と黒腐病の発病抑制能を有する葉面細菌の選抜と同定

Xcc 発光菌株との細菌競合試験により、Xcc 発光菌株の単独培養時と比較して共培養時に発光

レベルを著しく抑制する葉面細菌として、ミズナ、コマツナ、およびルッコラ原種の分離株の中からそれぞれ 10、4、12 菌株が選抜された。そのうちの 8 菌株（ミズナ、コマツナ、およびルッコラ原種分離株から、それぞれ 3、2、および 3 菌株）について、アブラナ科黒腐病の発病抑制効果を検討したところ、ミズナ分離株 1 菌株を除く全ての葉面細菌との混合接種区において Xcc 野生株の単独接種区と比較して病害の抑制が確認された。とくに顕著な発病抑制効果が確認されたミズナ分離株 Mi1-2A とルッコラ分離株 Ru1-8B の全ゲノム解析を行った。その結果、Mi1-2A 株は *Pantoea* 属菌、Ru1-8B 株は *Enterobacter* 属菌と同定され、いずれの菌株も T6SS をコードすると推定される遺伝子群を有することが確認された。しかし、発光ではなく、抗生物質耐性に基づいた細菌間競合試験の結果、Mi1-2A 株は Xcc の増殖抑制能を有するが、Ru1-8B 株は Xcc の増殖抑制能をもたないことが確認された。そこで、以後は Mi1-2A 株に焦点を当てて解析を進めることとした。

抗菌活性試験の結果、Mi1-2A 株は Xcc に対する抗菌物質産生能をもたないことが示唆された。Mi1-2A 株は Xcc だけでなく、アブラナ科黒斑細菌病菌 (*Pseudomonas cannabina* pv. *aisalensis*)、大腸菌に対しても細菌間競合試験において優位性を示すことが確認された。また、Mi1-2A 株と標的細菌との間を 0.2 μm のフィルターで隔てると競合優位性が見られなくなったことから、細菌間競合が接触に依存することが示唆された。Mi1-2A 株は Xcc との混合接種時だけでなく、Xcc を接種する 2 日前に前処理することによってもハクサイ苗の発病を著しく抑制することが確認された。Mi1-2A はゲノム上に T6SS をコードすると推定される遺伝子群を 2 つ有する (T6SS-1 および T6SS-2 と仮称)。そこで、それぞれの遺伝子群上の *tssC* 遺伝子を欠損させた変異株 ($\Delta tssC1$, $\Delta tssC2$ と仮称) を作出し、細菌間競合試験を行い、本菌による Xcc あるいは PcaI の増殖抑制能における本菌の T6SS の役割について検討した。その結果、 $\Delta tssC1$ 株では他細菌の増殖抑制がみられなくなったことから、Mi1-2A 株の T6SS-1 は他細菌との細菌間競合に関与することが示唆された。

以上のように、本研究では T6SS を介して植物病原細菌の増殖を抑制する葉面細菌 Mi1-2A を選抜・同定することができた。Mi1-2A 株の T6SS-1 が発病抑制能にも寄与しているかについては今後の植物接種試験により検討する必要がある。また、本菌が標的細胞にどのような毒エフェクターを分泌するのをはじめ、本菌の植物への定着能や植物体上での局在部位等についても解析していきたいと考えている。葉面細菌 Ru1-8B 株については、T6SS をコードする遺伝子群を有していたものの、抗生物質耐性に基づいた細菌間競合試験の結果、少なくとも Xcc の増殖抑制能を確認することができなかった。このことから、本菌による黒腐病の発病抑制は T6SS 以外の要因によるものと推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向川こひめ、宮地駿、中島雅己、古谷綾子
2. 発表標題 アブラナ科黒腐病菌に拮抗する葉面細菌の探索
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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