

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18653

研究課題名(和文) 生物防除微生物由来のスーパーオキシド生成エリシターの探索とその作用機構

研究課題名(英文) Screening of superoxide anion-producing elicitor from biocontrol microorganisms

研究代表者

佐藤 育男 (SATO, Ikuo)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：70743102

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)：本研究では、トマト病害に対する生物防除微生物である2株のPaenibacillus属細菌からエリシター(植物体の抵抗性を誘導する物質)の単離を試みた。細菌株の培養液および菌体画分をトマトリーフディスクに処理し、活性酸素生成活性を指標にエリシター活性を検出した。いずれの画分からも活性が検出されたが、これらの活性は不安定であった。一方、供試菌株から精製されたキシラナーゼを用いたところ活性酸素生成活性が検出された。また、同酵素をトマト根部に処理することで感染時特異的タンパク質遺伝子の発現上昇がみられたことから、同酵素がエリシターとして機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We screened for an elicitor from two Paenibacillus strains that have been reported as biocontrol agents against Fusarium crown root rot of tomato. Assays of elicitor activity were conducted with superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) producing activity using tomato leaf disc; culture filtrates and cell fractions of the strains had elicitor activity, but these activities were unstable. Apart from this, a xylanase purified from the culture filtrates of Paenibacillus strain had O<sub>2</sub><sup>-</sup> producing activity. In addition, gene expression of pathogenesis related protein in tomato roots were up-regulated by root treatment of the xylanase, suggesting that the enzyme functioned as an elicitor.

研究分野：植物病理学

キーワード：エリシター Paenibacillus

### 1. 研究開始当初の背景

微生物農薬は、近年の食の安全や環境に配慮した農業の推進から開発ニーズが高まっている。微生物農薬の開発に資する生物防除微生物の病害抑制機構を明らかにすることは、農業現場で発病抑制効果を最適化する処理法の開発といった応用的見地、および植物と生物防除微生物の相互作用の解明という基礎的見地からも重要である。生物防除微生物の病害抑制機構としては、病原菌に対する抗菌作用、栄養や生育場所の競合、植物への抵抗性誘導などが知られている。植物への抵抗性誘導の場合、植物体に作用するため、環境の影響が比較的少なく、効果が安定しやすいと考えられている。植物体の抵抗性誘導を引き起こす因子であるエリシターは植物と微生物間の相互作用を物質レベルで解明するために重要な物質であるが、病原菌のエリシターに比べ、生物防除微生物のエリシターに関する報告は少なく、一層の知見の蓄積が必要である。

### 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、トマト根腐萎凋病を抑制する生物防除微生物 *Paenibacillus* 属細菌 2 株 (12HD2 株、42NP7 株) を選抜し (図 1、引用文献) その病害抑制機構がトマトの抵抗性誘導によることを明らかにしているが、細菌株に含まれる抵抗性誘導因子 (エリシター) は不明である。本研究では、*Paenibacillus* 属細菌株の抵抗性誘導の作用機構を解明する目的で、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 生成活性を指標にした同細菌株由来エリシターの単離とその特性の解明を試みた。またこれとは別に供試菌株のキシラナーゼについて、 $O_2^-$  生成活性およびエリシター活性について解析を試みた。

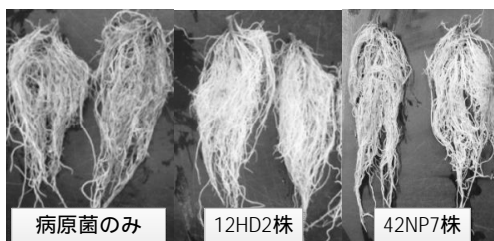


図 1 生物防除微生物 *Paenibacillus* 属 2 菌株によるトマト根腐萎凋病の抑制効果

### 3. 研究の方法

#### (1) エリシター粗画分の調製

滅菌したトマト根を添加した培地で細菌株を培養し、培養液画分と菌体画分を回収した。さらに菌体画分については、菌体破碎後に遠心分離および超遠心分離により、細胞質画分と細胞膜壁画分に画分した。これらをエリシター粗画分とした。これらの粗画分をプロテイナーゼ K で処理し、タンパク性のエリシターを確認した。培養液画分について

はイオン交換および疎水クロマトグラフィーカラムに供試し、画分した。

#### (2) $O_2^-$ 生成活性の検出

トマトリーフディスクを作製し、緩衝液を含む 96 穴プレートに浮かべ、(1) の画分を加えてエリシター処理を開始し、 $O_2^-$  蛍光プローブ (L012) および化学発光プレートリーダーを用いて  $O_2^-$  生成の検出・測定を行った。

#### (3) キシラナーゼの精製

*Paenibacillus* sp. 42NP7 株をトマト根部を含む 1/3LB 培地で培養し、得られた培養液を 20 mM 酢酸カリウム緩衝液 (pH5.2) 中で透析し、陽イオン交換カラム (SP-sepharose) を用いてキシラナーゼを精製した。

#### (4) 感染特異的タンパク質 (PR タンパク質) の遺伝子発現解析

精製キシラナーゼ酵素液にトマト根部を浸漬し、所定時間インキュベート後に根部を回収し、常法に従い RNA 抽出および RT-PCR を行い cDNA を調製し、PR タンパク質遺伝子 (PR1、PR3、PR5、PR6) を増幅するプライマーを用いて発現量をモニタリングした。

### 4. 研究成果

#### (1) 生物防除微生物由来スーパーオキシド生成エリシター ( $O_2^-$ ) の探索

生物防除微生物である *Paenibacillus* 属細菌 2 菌株の産生するタンパク質または低分子化合物を標的として、 $O_2^-$  生成エリシターの単離・精製を試みた。

調製した培養液、細胞質画分、細胞膜壁画分に画分し、これらをトマトリーフディスクに添加し、 $O_2^-$  生成を化学発光試薬を用いて測定したところ、いずれの画分からもリーフディスクの  $O_2^-$  生成活性が認められた。これらの画分をプロテイナーゼ K で処理したところ、いずれの画分も  $O_2^-$  生成活性が低下したことから、 $O_2^-$  生成エリシターはタンパク質性の物質であることが示唆された。このうち、植物体に直接接触作用すると考えられる培養液画分からのエリシタータンパク質の同定を試みた。同画分を透析膜に入れ、ポリエチレングリコールにより脱水濃縮後、脱イオン水で透析したところ、 $O_2^-$  生成誘導活性が上昇したことから、エリシタータンパク質は分子量 10kDa 以上であることが示唆された。

次にエリシターの精製を行うため、陽イオン交換、陰イオン交換および疎水クロマトグラフィーカラムを用いて溶出液を画分したが、いずれのカラムクロマトグラフィーを用いた場合にも、活性画分が検出されなかった。このことから、培養液画分のエリシタータンパク質は、不安定であること、複数のタンパク質によって  $O_2^-$  生成活性を誘導すること、あるいは活性の検出限界以下に希釈された可能性が考えられた。

(2) *Paenibacillus* sp. 42NP7 株のキシラナーゼの解析

*Trichoderma* 属糸状菌由来のキシラナーゼは植物細胞の  $O_2$  生成誘導活性を持つことが知られている(引用文献)。一方 *Paenibacillus* 属細菌はキシラン分解微生物として多く報告されており、一株で4つ程度のキシラナーゼアイソザイムを持つことが知られているが、そのエリシター活性に関する報告はない。そこで、トマト根腐萎凋病に対する生物防除微生物である *Paenibacillus* sp. 42NP7 株が産生するキシラナーゼに着目してエリシター活性を検証した。

*Paenibacillus* sp. 42NP7 株の培養液を SP-sepharose カラムに供試したところキシラナーゼ活性は4つの画分から検出された。このうち最も活性の高い画分を回収し、電気泳動的に単一であることを確認し、以降は精製標品として用いた。精製したキシラナーゼを用いて部分アミノ酸配列を解析した。これをもとに縮重プライマーを設計し、PCR 法によりキシラナーゼ遺伝子全長を取得した。本酵素および既知の微生物由来キシラナーゼの推定アミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹を図2に示した。本酵素の推定アミノ酸配列は *P. rhizosphere* 由来の glycoside hydrolase (GH) family 11 のキシラナーゼと100%一致した。一方で、*Trichoderma* 属菌由来のキシラナーゼの推定アミノ酸配列との相同性は56%以下であった。

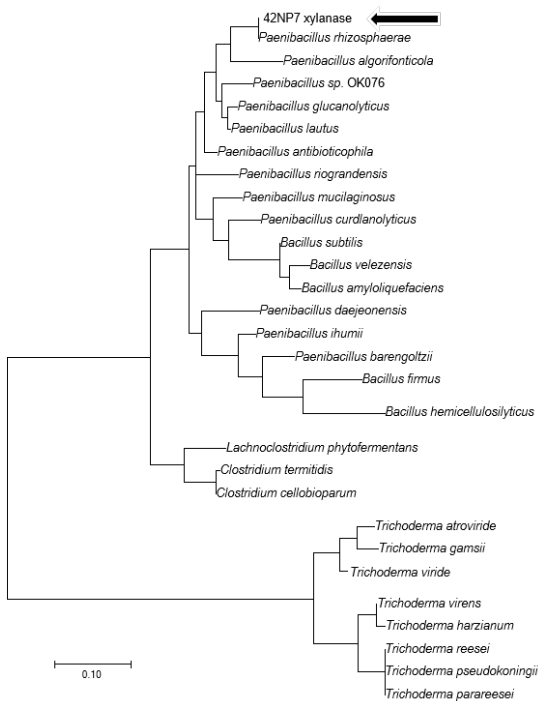


図2 GHファミリー11キシラナーゼの推定アミノ酸配列にもとづく分子系統樹。矢印は42NP7株由来のキシラナーゼを示す。

精製酵素を用いて、トマトリーフディスクでのスーパーオキシド( $O_2^-$ )生成活性を調査したところ、対照区(緩衝液処理区)よりも高い誘導活性が検出された。また、精製酵素をトマト苗の根部に処理することで複数のPRタンパク質をコードする遺伝子(PR1, 抗菌性タンパク質、PR3, 塩基性キチナーゼ)の発現量が対照区にくらべ増加した(図3)。以上から同キシラナーゼは  $O_2^-$  生成エリシターであることが示唆された。これまでキシラナーゼのエリシター活性は *Trichoderma* 属糸状菌由来のキシラナーゼで知られていたが、*Paenibacillus* 属細菌由来のキシラナーゼも同様にエリシター活性をもつことが示唆された。

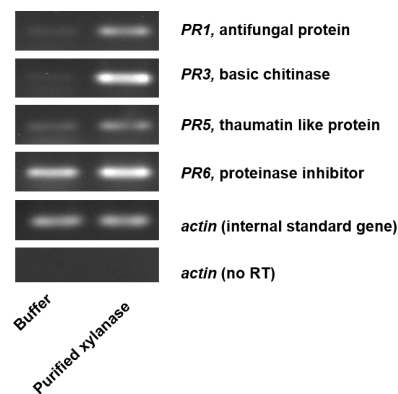


図3 キシラナーゼを処理された根部のPRタンパク質遺伝子の発現誘導

<引用文献>

Sato, I., Yoshida, S., Iwamoto Y., Aino M., Hyakumachi M., Shimizu M., Takahashi H., Ando S., Tsushima S., Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against Fusarium Crown and Root Rot of tomato. Microb. Environ., 2014, 29: 168-177.

Kim, S.J., Ko, J.H., Park, K.Y. et al. Generation of active oxygen species (AOS) and induction of  $\beta$ -Glucanase activity by fungal elicitor xylanase in the suspension cultured cells of Tobacco, J. Plant Biol., 1998, 41: 43-49.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

川北一人、佐藤育男、植物の生体防御機構における一酸化窒素の機能、Journal of Japanese Biochemical Society、査読有、2016、88(2): 192-197.

doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880192

佐藤育男、伊藤通浩、かび毒デオキシニ  
バレノールの分解微生物の探索およびそ  
の活用の可能性、バイオコントロール研究  
会レポート、査読有、2016、14:51-58.

〔学会発表〕(計 3 件)

長谷部量紀、千葉壮太郎、竹本大吾、川  
北一人、佐藤育男、Denitrification of a  
soil-born phytopathogenic fungus is  
involved in its pathogenicity、16th  
International Symposium on Microbial  
Ecology、2016年8月21-26日、Canada

澤田祐次、鈴木 萌、千葉壮太郎、竹本  
大吾、川北一人、佐藤育男、トマト植物体  
および栽培土壌からのフザリン酸分解微  
生物の分離と系統分布、関西植物病理学会、  
2016年9月29-30日、静岡

長谷部量紀、千葉壮太郎、竹本大吾、川  
北一人、佐藤育男、The dissimilatory  
nitrite reductase involved in the plant  
pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.  
sp. *lycopersici*、国際NO学会、2016年5  
月20-22日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 育男 (SATO, Ikuo)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：70743102