

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04904

研究課題名(和文)植物常在酵母が分泌する酵素による植物の健康維持作用

研究課題名(英文)The effect of phylloplane yeast enzyme on plant-pathogens interaction

研究代表者

北本 宏子 (Kitamoto, Hiroko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・ユニット長

研究者番号：10370652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：葉面常在性の担子菌酵母の多くは、糸状菌クチナーゼと20%程度似たエステラーゼを分泌する。Pseudozyma属酵母の同酵素PaEを精製し、植物および植物表面構成成分であるクチンへ高濃度で処理した実験でクチンを分解する活性を見出した。一方、PaEを低濃度で処理した植物では、双子葉、単子葉植物の別、病原の種別に関わらず病害に対する抵抗性が誘導された。植物ホルモン量に変化が無く、この病害抵抗性は、植物ホルモンの蓄積を介さない新規の経路であることが示唆された。植物ホルモンを介する抵抗性反応は、しばしば活性が拮抗する抵抗反応を抑制するが、PaEを処理した植物は、昆虫による食害に対し、影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地上にある植物の葉は、地球環境の維持に重要な役割を持つが、その表面の総面積は、海洋の総面積よりも広く、Pseudozyma属酵母などの担子菌酵母が常在しているが、その生態的役割は明らかにされていない。本研究では、Pseudozyma属酵母が分泌する酵素PaEを処理した植物が、病害抵抗性を示すこと、植物が持つ既知の病害抵抗性反応と異なり、害虫に対する抵抗性には影響を与えないことを明らかにした。応用面では、既に我々は、PaEの大量生産方法を報告しているので、化学農薬に代わる植物活性化剤としての用途が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Many of the basidiomycetous yeasts on leaf surfaces secrete esterase that resemble fungal cutinases by approximately 20%. The enzyme PaE was purified from the yeast Pseudozyma, and treated with high concentration on plant surfaces. The results showed that PaE has the activity to decompose cutin, a component of the cuticle layer. On the other hand, low concentrations of PaE induced disease resistance in dicotyledonous and monocotyledonous plants to the various types of pathogens tested. The disease resistance was not accompanied by the accumulation of phytohormones, which suggested a new pathway. Plant hormone-induced resistance often inhibits antagonistic resistance, but plants showing disease resistance by PaE treatment did not affect insect resistance.

研究分野：応用微生物学、生化学

キーワード：酵母 エステラーゼ 植物 病害抵抗性 Pseudozyma

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の表層を覆うクチクラ層は、微生物や昆虫、乾燥などから植物を物理的に保護している。クチクラ層は、クチン(脂肪酸ポリエステル)や脂肪酸を含む層で、その表面は、結晶化したワックス(アルカン)で覆われている。

クチクラ層が欠落したり、組成比が変化した植物変異体の葉は、水分の蒸散が高まる表現形を示すと共に、しばしば、植物病原菌に対する耐病性が向上する。この現象は、植物が、クチン分解物を検出して耐病性を高めているという説があり、病原菌の侵入に対する新たな自然免疫応答の存在が示唆されている。このクチクラ層を介した自然免疫機構を解き明かすためには、人為的にクチクラ層の破壊量を調節できる実験系を構築する必要がある。

我々は、これまでに植物常在性の酵母 *Pseudozyma antarctica* が分泌する新規のエステラーゼ(PaE)を、生分解性プラスチック(有機酸ポリエステル)分解酵素として発見した。PaE に似たエステラーゼは、葉面に常在する *Pseudozyma* 属や *Cryptococcus* 属酵母が分泌する。糸状菌クチナーゼとアミノ酸レベルで 20%程度類似しているため、クチナーゼ様酵素と呼ばれている。

高濃度の PaE を含む培養液を大量生産する方法を構築し、その培養ろ液を植物へ散布処理すると、水分の蒸散が高まり、植物体が枯死する現象や、クチクラ層が薄くなり、脂肪酸が遊離する現象を見出した。

一方、植物が備える既知の病害抵抗性反応と虫害抵抗性反応は、植物ホルモンで調節されており、しばしば拮抗することが知られている。しかし、自然界で植物は、病原菌と害虫による被害を同時に受けた時の病虫害抵抗反応は、明らかにされていない。

2. 研究の目的

PaE 等のクチナーゼ様酵素がクチンを壊す可能性、および植物に対する PaE やクチンの処理濃度を調節することによって、植物の自然免疫反応が活性化され、病害抵抗性が高まる可能性を調べる。

植物が病虫害の被害を同時に受けるような複数の生物が関わる関係において、病原菌の代わりに PaE の処理濃度を調節して、安定的に病害抵抗性を示している植物体を作る。この応答が既知の病害抵抗性反応と同一かどうかを解析する。また、害虫への応答を調べることで、植物表層の破壊から見いだされる新規の応答反応の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 植物表層の構造と常在菌酵素による分解様式

P. antarctica の培養ろ液から、植物表層を破壊する酵素画分を選定した。具体的には、培養ろ液主成分である、PaE とキシラナーゼを、カラムクロマトグラフィー等を用いて分離し、各画分を処理した植物表層の構造変化を、走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。葉面常在性担子菌酵母である *Cryptococcus* 属菌のクチナーゼ様酵素も精製した。また、トマト葉および果皮から、メタノールとクロロホルムに不溶な画分であるクチンを調製した。クチンのアルカリ加水分解物をクチンモノマー標準物質として用いて、クチナーゼやクチナーゼ様酵素処理による分解産物の構造を、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)で分析した。

(2) 植物表層分解酵素の処理による植物の生理的影響の解析

P. antarctica の培養ろ液精製画分の中から、シロイヌナズナの灰色かび病菌による病害抵抗性誘導を詳細に調べ、萎凋症状を示さないで病害抵抗性誘導をする酵素を同定するとともに、そのための処理濃度域を調べた。酵素処理後の植物の遺伝子発現解析や、遺伝子変異体の応答を生理・生化学に解析し、自然免疫反応の制御反応で顕著に変化する遺伝子を見いだした。

具体的には、培養ろ液や、精製 PaE を、PaE の生分解性プラスチックを分解する活性を基準として濃度を調整した。酵素液の濃度を段階的に変えて植物体に処理後、3 日後に灰色かび病原菌の胞子を処理した後、経日的に観察し、病徴から発病度を測定した。

病害抵抗性の情報伝達経路を解析するために、低濃度 PaE 処理を行ったトマト、シロイヌナズナ植物体から経日的にストレス応答遺伝子の発現、植物ホルモンおよびストレス応答物質の定量を行った。遺伝子発現を解析するために、各処理植物から RNA を抽出し、ストレス応答に特徴的な遺伝子発現を qRT-PCR によって定量した。また、遺伝子情報が豊富なシロイヌナズナを用いてマイクロアレイ解析を行った。

植物がストレス応答で蓄積するジャスモン酸やサリチル酸を植物から抽出し、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)によって分析、定量した。

(3) 植物表層分解酵素を処理した植物の害虫に与える影響解析

低濃度 PaE 処理によって誘導された、病害抵抗性を示している植物体において、害虫の食害量、産卵数を測定することで、害虫に与える影響を評価した。具体的には、害虫として、農業害虫である咀嚼型害虫(コナガ)や、吸汁型害虫(ナミハダニ)を用いた。食害量は、未被害時の重量からどれくらい被害時の重量が減少したかを経日的に算出した。産卵数は、1cm²の葉切片を切り出し、その上に害虫を乗せ、経日的に産卵した卵数を計数した。

(4) クチナーゼ様酵素を処理した植物の病害抵抗性の普遍性

Cryptococcus 属菌由来のクチナーゼ様酵素精製物を処理したトマト切り葉の灰色カビ病菌に対する抵抗性を調べた。

単子葉植物のエンバクとバクテリア病原菌、双子葉植物のタバコと病原性ウイルスの組み合わせで、PaE を含む培養ろ液処理による病害抵抗性を調べた。

4. 研究成果

(1) 植物表層の構造と常在菌酵素による分解様式

PaE とキシラナーゼを、カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。またエタノール沈殿処理により、PaE 活性を保ちキシラナーゼを失活させる粗精製酵素調製方法を確立した。

PaE 処理は、植物表層の構造を大きく変化させるが、キシラナーゼ処理は影響しなかった。トマト葉および果皮から調製したクチンの加水分解物から、クチンモノマーとして知られている Dihydroxyhexadecanoic acid (C18:1 ω OH) を検出し、クチンが調製できたことを確かめた。続いてクチンへ PaE、他のクチナーゼ様酵素、および糸状菌クチナーゼを処理した可溶性画分から C18:1 ω OH を検出したことから、PaE を含むクチナーゼ様酵素にクチナーゼ活性があることを明らかにした。

(2) 植物表層分解酵素の処理による植物の生理的影響の解析

トマト葉は、高濃度の PaE 単独、およびキシラナーゼ併用処理では発病したが、キシラナーゼ単独処理では病徴が現れなかった (図 1)。(1) で得た結果と併せて、PaE 処理では、植物の表層構造が変化することにより、植物の感染が助長されると考えられた。続いて、PaE の活性を指標に希釈した培養ろ液を処理した結果、酵素処理を行わないコントロール区に比べて、病原菌の葉への侵入や病原菌の DNA 量が、低く抑えられる処理濃度域を見出した。(図 2)。シロイヌナズナを用いて、精製 PaE を処理した実験で、病害抵抗性を示す酵素濃度域を確認したため、以降 (2) (3) の実験には、(1) で調製した粗精製酵素 (エタノール処理でキシラナーゼを失活) を用いた。

病害抵抗性増強作用の情報伝達経路を解析するために、シロイヌナズナに対する粗精製酵素処理後 3 日目に、代表的な病害抵抗性遺伝子 (サリチル酸 SA を介した経路は BGL2, PR1, ジャスモン酸 JA を介した経路は PDF1.2) を指標にして、遺伝子発現レベルの変化を解析した。その結果、いずれも発現レベルが大きく上昇し、幅広い抵抗性誘導経路が応答している様子が示された。これらの病害応答性遺伝子の発現レベルは、PaE 処理後 1 日後の方が、3、7 日後よりも高かった。この結果を基に、シロイヌナズナに対し PaE 処理後 1 日目の RNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現レベル変化をマイクロアレイで調べた。マイクロアレイの解析結果から、植物の病害抵抗性に関わる遺伝子や様々なストレスホルモン合成や応答に関わる遺伝子が多数変化していることが明らかとなった。しかし、植物ホルモンや植物ストレスホルモンである JA や SA 自体は有意な蓄積は見られなかった。このことから、低濃度 PaE 処理による病害抵抗性誘導は、JA や SA の蓄積を介さない、新しい情報伝達経路が関与していることが示唆された。

PaE による重要な情報伝達経路を選定するために、変異体を用いた解析を行った。シロイヌナズナの JA、SA、エチレン、アブシジン酸の情報伝達経路の変異体に対し、低濃度 PaE 処理を行い、その後病原菌を接種した結果その病徴には、変異株で顕著な変化は見いだせなかった (図 3)。病原菌の DNA 量の定量においても同様の結果であった。これらのことから、低濃度 PaE 処理は、植物ホルモンなどの生理活性物質による誘導を介さずに、さまざまな情報伝達経路を活性化することで病害抵抗性を誘導していることが示唆された。

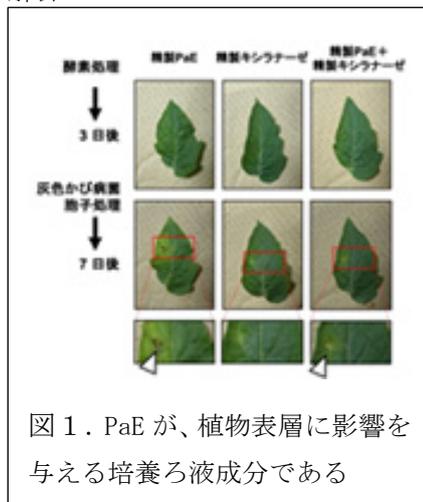


図 1. PaE が、植物表層に影響を与える培養ろ液成分である

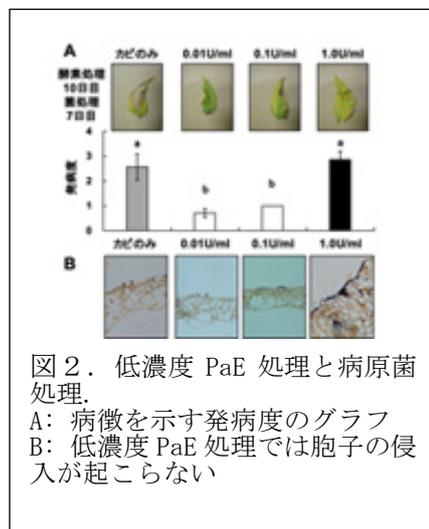


図 2. 低濃度 PaE 処理と病原菌処理。
A: 病徴を示す発病度のグラフ
B: 低濃度 PaE 処理では胞子の侵入が起こらない

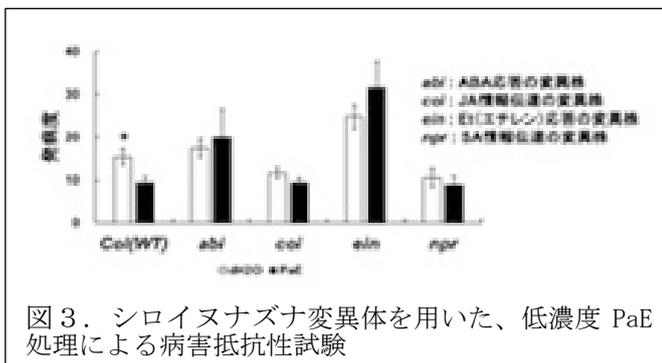


図 3. シロイヌナズナ変異体を用いた、低濃度 PaE 処理による病害抵抗性試験

(3) 植物表層分解酵素を処理した植物の害虫に与える影響解析

植物へ、病害抵抗性を示す濃度の PaE 処理を行った後、害虫を接種した後の食害量は、低濃度 PaE 処理の有無によって変化しなかった (図 4)。また、ナミハダニの雌成虫を接種し、その産卵数を測定したところ、低濃度 PaE 処理の有無によって、産卵数は変化しなかった (図 4)。このことから、PsE 処理により病害抵抗性を示す植物では、害虫による食害抵抗性に影響を与えないことが明らかとなった。

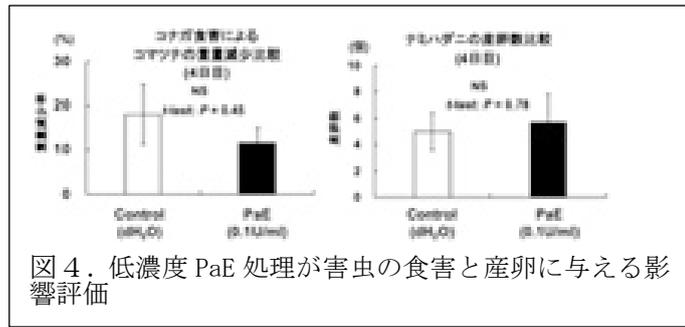


図 4. 低濃度 PaE 処理が害虫の食害と産卵に与える影響評価

(4) クチナーゼ様酵素を処理した植物の病害抵抗性の普遍性

Cryptococcus 属菌由来のクチナーゼ様酵素精製物を処理したトマト切り葉は、灰色カビ病菌に対する抵抗性を示した。このことから、葉面常在担子菌酵母のクチナーゼ酵素を処理した植物の病害抵抗性が示された。

P. antarctica 培養ろ液を処理した単子葉植物のエンバクとバクテリア病原菌、双子葉植物のタバコと病原性ウイルスの、いずれの組合せでも、PaE 処理によって、病徴が低減され、抵抗性が確認できた (図 5)。この結果から、*P. antarctica* 培養ろ液は、様々な植物種で、真菌・細菌・ウイルス病に対する病害抵抗性を誘導することが示された。

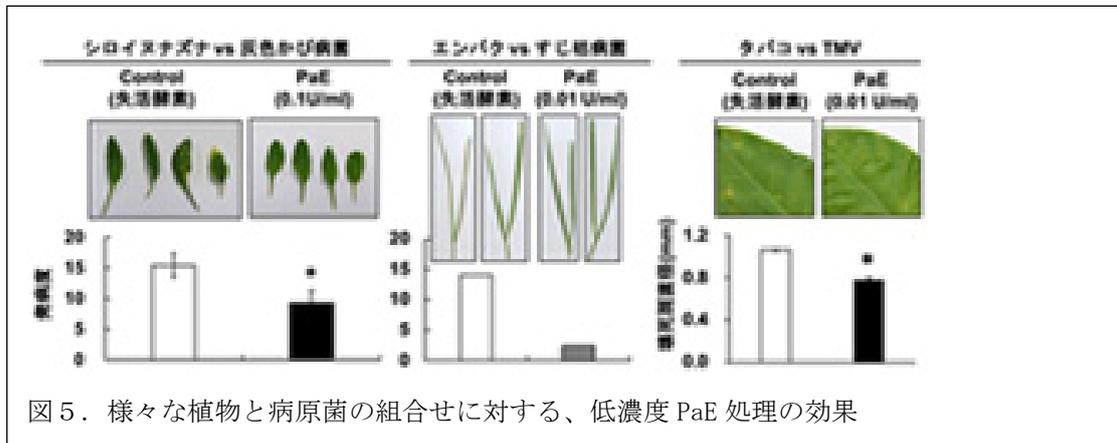


図 5. 様々な植物と病原菌の組合せに対する、低濃度 PaE 処理の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ueda Hirokazu, Kurose Daisuke, Kugimiya Soichi, Mitsuahara Ichiro, Yoshida Shigenobu, Tabata Jun, Suzuki Ken, Kitamoto Hiroko	4. 巻 8
2. 論文標題 Disease severity enhancement by an esterase from non-phytopathogenic yeast <i>Pseudozyma antarctica</i> and its potential as adjuvant for biocontrol agents	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-34705-z	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 Hirokazu Ueda, Soichi Kugimiya, Jun Tabata, Hiroko Kitamoto, Ichiro Mitsuahara	4. 巻 4
2. 論文標題 Accumulation of salicylic acid in tomato plant under biological stress affects oviposition preference of <i>Bemisia tabaci</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Interactions	6. 最初と最後の頁 73-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17429145.2018.1550220	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 Kitamoto Hiroko	4. 巻 foz53
2. 論文標題 The phylloplane yeast <i>Pseudozyma</i> : a rich potential for biotechnology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1093/femsyr/foz053	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鎗水 徹、植田 浩一、北本 宏子
2. 発表標題 担子菌系酵母 <i>Pseudozyma antarctica</i> のウラシル要求性を指標とした形質転換
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植田浩一、黒瀬大介、釘宮聡一、光原一朗、田端純、小坂橋基夫、北本宏子
2. 発表標題 葉面常在菌由来の生分解性プラスチック分解酵素と植物病原菌を利用した除草効果
3. 学会等名 植物感染生理談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 植田浩一、黒瀬大介、釘宮聡一、光原一朗、吉田重信、田端純、鈴木健、北本宏子
2. 発表標題 葉面常在菌由来の分泌する生分解性プラスチック分解酵素は、植物表層を分解する
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Kitamoto and Hirokazu Ueda
2. 発表標題 Phyllosphere yeast <i>Pseudozyma</i> secretes esterase that degrades lipid component of plant cuticle layer
3. 学会等名 2016 KSBB Fall meeting and international symposium (韓国生物工学会 招待講演) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hirokazu Ueda, Shigenobu Yoshida, Jun Tabata, Souichi Kugimiya, Ken Suzuki, Ichiro Mitsuhashi, and Hiroko Kitamoto
2. 発表標題 Extracellular esterase of phylloplane yeast <i>Pseudozyma antarctica</i> degrades the lipid component of the plant cuticle layer
3. 学会等名 The 14th International Congress on Yeasts (ICY14) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 植田 浩一,黒瀬大介(農観研・JSPS・CABI),釘宮 聡一,渡部貴志(農観研),光原 一郎,田端 純,小坂橋 基夫,北本 宏子
2. 発表標題 生分解性プラスチック分解酵素と植物病原菌を利用した除草効果
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部例会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 植田 浩一,黒瀬 大介,釘宮 聡一,光原 一郎,田端 純,小坂橋 基夫,北本 宏子
2. 発表標題 葉面常在菌由来の生分解性プラスチック分解酵素と植物病原菌を利用した除草効果
3. 学会等名 「つくば植物研究者ネットワーク」第1回集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 植物の病害抵抗性増強用又は植物病害防除用組成物及びそれらの使用方法	発明者 北本、小坂橋、吉田、植田、渡部、釘宮、田端、光原	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/019504	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 植物の病害抵抗性増強用又は植物病害防除用組成物及び それらの使用方法	発明者 北本、小坂橋、吉田、植田、渡部、釘宮、田端、光原	権利者 農研機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-104064	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 害虫を防除するための組成物及び害虫を防除する方法	発明者 北本、植田、田端	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2020-63199	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	釘宮 聡一 (Kugimiya Soichi) (10455264)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員 (82111)	
研究分担者	田端 純 (Tabata Jun) (20391211)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員 (82111)	
研究分担者	光原 一郎 (Mitsuhashi Ichiro) (80370683)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員 (82111)	
研究分担者	吉田 重信 (Yoshida Shigenobu) (90354125)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・グループ長 (82111)	
研究分担者	植田 浩一 (Ueda Hiromasa) (20432594)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター・研究員 (82111)	