

令和元年6月21日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07628

研究課題名(和文)パチルス属菌由来の環状リポペプチドによるシロイヌナズナの病害抵抗性制御機構の解明

研究課題名(英文) Induced disease resistance by cyclic lipopeptide derived from *Bacillus* sp. on *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

横田 健治 (YOKOTA, Kenji)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80349810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パチルス属細菌が分泌生産する環状リポペプチド(cLP)について、病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果及びその機構を明らかにした。Iturin A及びsurfactinは、レタス及びキャベツに対し、病害抵抗性誘導に依存した顕著な病害抑制効果が認められた。しかし、薬害が認められない過剰処理濃度では病害抑制効果が消失した。そして、効果が消失する処理濃度はcLP分子種と宿主植物の組合せにより相違した。シロイヌナズナ及びその変異株を使用し、過剰処理濃度で消失するcLPの病害抑制効果の制御機構について解析したところ、既知の主要な2種類の病害抵抗性誘導の制御系以外の新規の制御機構の存在を強く示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病害抑制効果を示すパチルス属菌株が生産する環状リポペプチド(cLP)は、宿主植物の病害抵抗性誘導能を示すことが報告された。本研究では病害抵抗性誘導能に依存した病害抑制効果の評価系により、レタス及びキャベツを宿主として2種類のcLPの病害抑制効果を評価した。両cLPは両植物に対して病害抵抗性誘導に依存した顕著な病害抑制効果を示した。さらに、cLPを過剰濃度として処理すると、病害抑制効果の消失が認められ、それらの挙動はcLP分子種と宿主植物種の組合せにより、若干異なった。本属菌株は国内外を問わず、生物農薬として広く使用されることから、その散布量を規定するための基礎的な知見となった。

研究成果の概要(英文)：Disease suppressions conferred by treatment of cyclic lipopeptides iturin A and surfactin derived from *Bacillus* sp. were evaluated. Both of iturin A and surfactin conferred significantly disease suppressions depending on induced disease resistant on lettuce and cabbage, respectively. However, losses of disease suppression were observed by the treatments at higher concentration of cyclic lipopeptides and the concentrations to cause the loss of disease suppression were different among the combination of cyclic lipopeptides and host plants. Our results might offer enhanced disease suppression by using of cyclic lipopeptides-producing *Bacillus* spp.

研究分野：植物保護科学

キーワード：Bacillus cyclic lipopeptide

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物病害に対して生物防除活性を示す *Bacillus* 属細菌は多数報告されており、生物防除剤として市場に出回っている。これらの有用菌株の多くは環状リポペプチドを生産し、それが *Bacillus* 属細菌の生物防除活性の主体であることが予想されてきた。そして環状リポペプチドの作用機構には、その各種植物病原性に対する抗菌活性が以前から予想されてきたが、最近になって宿主植物の病害抵抗性を誘導することが新しく知られている。また、環状リポペプチドの分子種と宿主植物の間には、病害抵抗性誘導に関する厳密な特異性が存在することが予想されている。

我々は、環状リポペプチドの病害抑制効果を評価するため、アブラナ科タアサイを宿主植物とした土壌病害を対象として試験した結果、環状リポペプチド iturin A 及び surfactin の精製物は各々、有意な病害抑制効果を示すことを明らかにした。そして、病害抑制効果が認められる環状リポペプチドの土壌処理濃度では、土壌中の病原菌数は減少しないことから、その病害抑制機構は病害抵抗性誘導に依存していることを予想した。そして、両環状リポペプチドは共に、その処理濃度を高めると病害抑制効果が消失するという奇異な現象を見出した。そして、病害抑制効果が認められる処理濃度域が環状リポペプチドの分子種間で異なると想定すると、他の研究グループが指摘している環状リポペプチド分子種と宿主植物種間の特異性に対して、同一の植物種に対して複数種の環状リポペプチドが病害抵抗性誘導能を示すが、効果を示す処理濃度域が異なるために見落としていたと説明できる。環状リポペプチドは、既知の病害抵抗性誘導剤とは異なり、抗菌活性もその機能として併せ持つことから、その病害抵抗性誘導においては宿主植物の新規の応答制御機構が存在することが示唆された。

### 2. 研究の目的

*Bacillus* 属細菌が生産する環状リポペプチドは、病原菌に対する抗菌活性の他に、宿主植物に対する病害抵抗性誘導能を持つことが報告されている。我々は、アブラナ科タアサイを宿主植物として、環状リポペプチドの植物病害抑制効果を評価した際に、処理濃度を段階的に設定したことで、過剰な処理濃度では病害抑制効果が消失する現象を見出した。病害抵抗性誘導剤の処理濃度に応じて病害抑制効果が発揮あるいは消失する現象は報告例が無く、これは植物側が環状リポペプチドの濃度に応じて異なる応答機構をもつ可能性を示唆する。そこで本研究では、アブラナ科キャベツ及びキク科レタスを用いて、タアサイで見出された現象が他の植物種に対しても同様に引き起こされるかを検証するとともに、モデル植物であるシロイヌナズナ及びその変異体を宿主植物として、病害抑制効果と環状リポペプチド処理濃度依存的な宿主植物の病害抵抗性応答機構を解明した。

### 3. 研究の方法

#### (1) レタス土壌病害を対象とした環状リポペプチド精製物の病害抑制効果

既報のタアサイと同様の実験系で評価した。すなわち、育苗したレタス苗の根部を洗浄後、病原菌懸濁液に浸漬して接種した後、環状リポペプチド精製物を含む土壌へ移植した。移植後、経日的に発病度を計測して、環状リポペプチド iturin A 及び surfactin の精製物の病害抑制効果を評価した。

#### (2) キャベツ葉面細菌病害を対象とした環状リポペプチド精製物の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果

国内の葉面病原性細菌の中から、環状リポペプチド iturin A 及び surfactin に耐性を示し、アブラナ科植物に病原性を示す菌株を選抜した。選抜病原菌株を使用して、キャベツを宿主植物とした環状リポペプチド精製物の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果を評価した。すなわち、水耕栽培により育苗したキャベツ苗を、環状リポペプチド精製物を含む水耕液へ移植した後、葉面に病原菌懸濁液をインフィルトレーション法により接種した。病原菌接種後、経日的に発病率を計測して、iturin A 及び surfactin の精製物の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果を評価した。

#### (3) シロイヌナズナ及びその変異体を宿主とした環状リポペプチド精製物の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果及びその制御機構

モデル植物であるシロイヌナズナは病害抵抗性誘導の制御系及び制御に関与する遺伝子群がすでに同定されており、関連遺伝子の欠損株を入手、使用することが可能である。そこで、前項のキャベツでの実験系により、シロイヌナズナを宿主とした病害抑制効果の評価系を確立し、既知の2つに大別される病害抵抗性誘導経路のどちらが病害抑制に関与するかを、シロイヌナズナ変異株を宿主として評価した。さらに互いに拮抗することが知られている既知の病害抵抗性誘導経路について、環状リポペプチド精製物の過剰処理濃度下において病害抑制効果の消失を引き起こす制御機構についても評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) レタス土壌病害を対象とした環状リポペプチド精製物の病害抑制効果

系統の異なる4種類のレタス品種を宿主植物として、環状リポペプチド iturin A 及び surfactin

精製物の病害抑制効果を各々評価した。Iturin A の処理では、何れのレタス品種も 0.94mg/L 土壌において有意な病害抑制効果が認められ、1.88 mg/L 土壌以上の処理濃度では、1 品種を除く全品種において病害抑制効果が消失した。一方、surfactin では 0.94 もしくは 1.88 mg/L 土壌以上で有意な病害抑制効果が認められ、その効果は 7.5 mg/L 土壌まで認められた。これらの結果は、レタスにおいては、タアサイとは異なって、顕著な病害抑制効果を示す処理濃度域が環状リポペプチド分子種間で異なり、宿主植物種と環状リポペプチド分子種の組合せにより、挙動が異なることを明らかにした。

(2) キャベツ葉面細菌病害を対象とした環状リポペプチド精製物の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果

キャベツを宿主とした水耕栽培の実験系により、病害抵抗性誘導に依存した環状リポペプチドの病害抑制効果を評価した。環状リポペプチド精製物を水耕液に添加して、キャベツ根部に処理することで、surfactin では 0.06 から 1  $\mu$ M の濃度範囲で、iturin A では 0.06 から 0.5  $\mu$ M の濃度範囲で有意な病害抑制効果が認められた。一方、両環状リポペプチドは共に、2 もしくは 1  $\mu$ M 以上の処理濃度で、薬害ではない、病害抑制効果の消失が認められ、この現象は既報のタアサイを宿主とした土壌病害抑制効果と同様の現象であった。

(3) シロイヌナズナ及びその変異体を宿主とした環状リポペプチド精製物の病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果及びその制御機構

シロイヌナズナを宿主植物として、環状リポペプチドの病害抵抗性誘導に依存した病害抑制効果を検証した。Surfactin では 4~16  $\mu$ M、iturin A では 0.5~2  $\mu$ M の処理濃度において、顕著な病害抑制効果が認められた。また、surfactin では 32  $\mu$ M、iturin A では 4  $\mu$ M 以上の処理濃度で病害抑制効果が消失した。同科のタアサイやキャベツでは、両環状リポペプチドは、ほぼ同等のモル濃度で病害抑制効果が認められたことから、属レベルの相違により環状リポペプチド分子種間で病害抑制効果を示す濃度範囲が異なることを明らかにした。

既知の病害抵抗性誘導経路である SAR 経路と ISR 経路について、各経路の誘導に必須となるサリチル酸及びエチレンの生合成遺伝子を欠損したシロイヌナズナ変異体を宿主として各環状リポペプチドの根部処理による病害抑制効果を評価したところ、環状リポペプチド処理による病害抵抗性誘導は SAR 経路を主体とすることが判明した。また、環状リポペプチドの過剰処理濃度下における病害抑制効果の消失は、ISR 経路の発現による SAR 経路の拮抗阻害ではないことが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shohei Fujita, Kenji Yokota, Disease suppression by the cyclic lipopeptides iturin A and surfactin from *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of lettuce, *Journal of General Plant Pathology*, 査読有、85 巻、2019、44-48

〔学会発表〕(計 3 件)

Carla Suzuki, Yusuke Yanai, Hirosuke Shinohara, Kenji Yokota, Conferring of antimicrobial independent disease suppression of black spot on cabbage by cyclic lipopeptide, 平成 31 年度日本植物病理学会大会、2019

椎名 繁晶、梶川 揚申、五十君 静信、篠原 弘亮、横田健治、枯草菌由来の環状リポペプチドによるシロイヌナズナの病害抵抗性誘導応答、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018

Mana Kaneko, Yuta Kurosawa, Kenji Yokota, Antimicrobial-independent disease suppression by *Bacillus* cyclic lipopeptide on *Arabidopsis* bacterial disease, 16th International Symposium on Microbial Ecology, 2016

〔図書〕(計 1 件)

豊田 剛己 編、朝倉書店、土壌微生物学、pp. 80-87、2018、8. 有用微生物 3 -植物生育促進根圏微生物-

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：門田 有希

ローマ字氏名：(MONDEN, Yuki)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：環境生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30646089

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、研究者個人に帰属されます。