

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15233

研究課題名(和文) ムギ類を汚染する赤かび病発生とかび毒蓄積の微生物的防除研究

研究課題名(英文) Biological control for Fusarium head blight and the fusarium toxins accumulation

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コムギ赤かび病発生とかび毒デオキシニバレノール(DON)の蓄積の両方を高度に抑制する微生物防除候補株の選抜を試みた。簡便な発病抑制試験を実施するため、発芽コムギを用いた試験方法を確立し、発病およびDONの蓄積を抑制する3株を選抜した。新規DON分解代謝酵素の同定について、DON代謝変異株を取得し、NGS解析による変異箇所同定、および候補遺伝子を異種発現を目指した。UV処理での変異条件の最適化を行い、変異処理後の約2000株のDON代謝能を調査した。その結果DON代謝能欠損株を20株得ることに成功した。今後は、変異株の変異箇所およびコード遺伝子を決定する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は作物上での、かび毒の蓄積と植物病害の発生の双方を抑制する微生物の選抜と機能解析を目指したものである。加えて、DONはかび毒であり病原性関連因子でもあるので、病原性関連因子を分解できる微生物の処理によって植物病原菌の病徴発現をも抑制が可能かを検証した研究でもある。本研究によって、病原性関連因子を分解する微生物が発病抑制に貢献していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to select candidate strains as biocontrol agents for Fusarium Head Blight and deoxynivalenol (DON) Accumulation. In order to conduct a convenience disease suppression test, we established a test method using germinating wheat and selected three strains that suppressed the disease development and DON accumulation. To identify novel DON degrading and metabolizing enzymes, we created DON metabolizing mutant lines. 2000 mutant lines were examined for their DON metabolizing ability by optimizing the mutation conditions in UV treatment. As a result, we succeeded in obtaining about 20 strains that were deficient in DON metabolism. In the future, we will determine the mutation sites and the coding genes of the mutant strains.

研究分野：植物保護学

キーワード：生物防除 かび毒 植物病害 病原性関連因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

赤かび病は *Fusarium graminearum* 主複合体が引き起こす穀類の最重要病害の一つであり、コムギ、オオムギなどで穀粒の肥大化の阻害や、穂枯れを引き起こすとともにかび毒を蓄積する。デオキシニバレノール (DON) は最も高頻度に検出されるかび毒で、接種した人畜に毒性を示し、嘔吐や下痢といった急性毒性症状が表れる。低濃度であっても、長期にわたる DON の摂取は成長抑制や免疫機能の低下といった慢性毒性症状を引き起こすため各国で規制値が設けられた。日本では一部のコムギが比較的高濃度に DON に汚染されていることが報告され、2002 年に厚生労働省によりコムギの DON 暫定基準値 (1.1 ppm) が設定されており DON を基準値以下にする技術の開発が急務となっている。

コムギでの赤かび病菌の感染と DON の蓄積は化学農薬の使用による抑制が可能であるが、化学農薬の使用できない収穫前の時期にも赤かび病菌の感染と DON の蓄積が進行する。また、DON は熱・化学安定性が高く、いちど穀粒に蓄積すると調理や加工工程での完全な除去は困難となる。このようにコムギ赤かび病は、発病そのものによる穀粒の品質低下と、DON の蓄積の 2 つが問題となっており、両者を解決できるような防除法を開発することが望まれる。DON は、人畜のみならず植物に対しても毒性を示し、コムギに対してはその防御応答系を阻害し、赤かび病菌の感染拡大を助長する病原性因子としても知られている。したがって、申請者らは栽培中のコムギ小穂の DON を低減できれば、赤かび病の発生も抑制できると考えた。微生物を用いた DON の生物分解法は、物理、化学的分解法に比べ穀類の栄養成分への影響や環境への負荷が少ないこと、また、微生物酵素のもつ基質特異性から DON だけの選択的分解が可能であることから有望視されている。そこで申請者らは、過去に分離した 15 株の DON 分解菌を用いて、DON の蓄積および病害発生を抑制する微生物株の選抜、および DON 代謝酵素の同定を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに分離された 15 株の DON 分解細菌を用いて、第 1 にコムギの赤かび病発生と DON の蓄積の両方を抑制する微生物防除候補株を選抜し、第 2 に未同定の初発 DON 代謝酵素遺伝子の探索を行った。

1. 赤かび病発生と DON の蓄積の両方を高度に抑制する微生物防除候補株を選抜

これまでに DON 分解微生物を用いた赤かび病の発生抑制の検証はなされていない。DON 分解微生物が発生抑制に寄与するか検証した。

2. 未同定の初発 DON 代謝酵素遺伝子の探索

これまでに *Devosia* 属と *Sphingobium* 属菌株からの初発 DON 代謝酵素遺伝子が明らかになっている。一方、*Nocardioides* 属 (とその近縁種の *Marmoricola* 属) 菌株の DON 代謝酵素については未同定である。*Nocardioides* 属の初期 DON 代謝産物は *Devosia* 属と *Sphingobium* 属菌株のそれとは異なり、別のタイプの酵素を有すると予想される。

3. 研究の方法

DON 分解細菌を用いたコムギ小穂での赤かび病の発生抑制と DON 低減の評価、および防除候補株の選抜

赤かび病発生と DON の蓄積の両方を高度に抑制する微生物防除候補株の選抜を試みた。申請者らが過去に分離した 15 株の DON 分解細菌を用いてコムギ発病抑制効果を検証した。簡便な発病抑制試験を実施するため、コムギ赤かび病菌の病原性試験に用いられている Petri dish test (Purahong et al., 2012) の方法を参考に、発芽コムギを用いた試験方法を確立した。この方法では、表面殺菌したコムギ種子を発芽させ、DON 分解細菌を接種した後に、コムギ赤かび病菌の胞子を接種する。観察は孢子接種 6 日後に行い、伸長した葉の長さを調べることで発病抑制効果を調査した。

未同定の DON 代謝酵素遺伝子の同定

これまでに *Devosia* 属と *Sphingobium* 属菌株からの初発 DON 代謝酵素遺伝子が明らかになっている。一方、発病抑制効果の高い *Nocardioides* 属（とその近縁種の *Marmoricola* 属）菌株の DON 代謝酵素については未同定である。本研究では *Nocardioides* 属細菌株の同酵素を精製し、遺伝子のクローニングを試みた。

4. 研究成果

赤かび病発生と DON の蓄積の両方を高度に抑制する微生物防除候補株の選抜

申請者らが過去に分離した 15 株の DON 分解細菌を用いてコムギ発病抑制効果を検証した。簡便な発病抑制試験を実施するため、コムギ赤かび病菌の病原性試験に用いられている Petri dish test (Purahong et al., 2012) の方法を参考に、発芽コムギを用いた試験方法を確立した（図 1）。葉の長さや DON の蓄積量には負の相関が見られ、3 株が有意に発病と DON 蓄積の抑制効果を示した。なお、ポット栽培したコムギ穂を用いて発病抑制試験を行ったところ、Petri dish test の発病抑制効果と相関が見られ、一次選抜としての Petri dish test の有用性を明らかにできた。

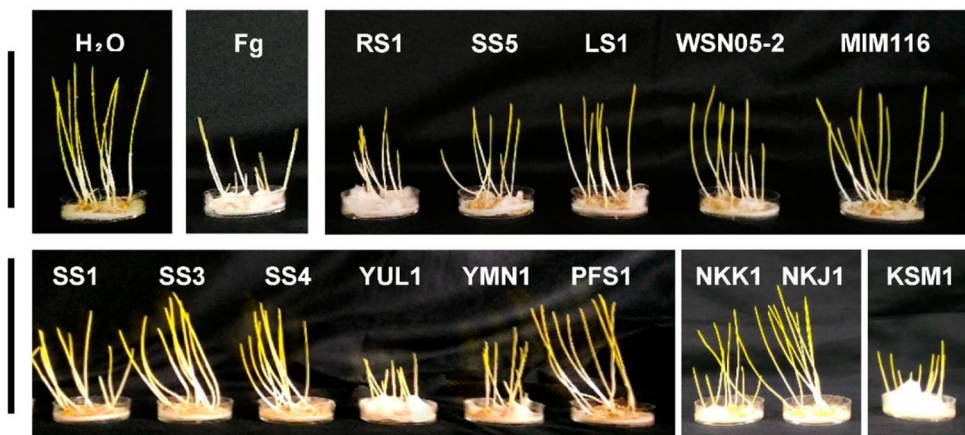


図 1 Petri dish test を用いた発病抑制効果の検証

新規 DON 分解代謝酵素の探索

DON 分解細菌 *Nocardioides* spp.の細胞抽出液中からの酵素活性の測定法を確立できなかったため、DON 代謝変異株を取得し、NGS 解析で変異箇所の同定および候補遺伝子を異種発現させることを目指した。DON 代謝能変異株の作出については、UV 処理での変異条件の最適化を行い、変異処理後の約 2000 株の DON 代謝能を調査した。その結果 DON 代謝能を失った株および初期段階で分解代謝が止まる株を約 20 株得ることに成功した。今後は、変異株の NGS 解析を行い変異箇所およびコードする遺伝子を決定する。また、得られた DON 代謝能変異株を用いて、発病抑制効果の相違について明らかにする。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroyuki Morimura, Michihiro Ito, Shigenobu Yoshida, Motoo Koitabashi, Seiya Tsushima, Maurizio Camagna, Sotaro Chiba, Daigo Takemoto, Kazuhito Kawakita, Ikuo Sato	4. 巻 -
2. 論文標題 In Vitro Assessment of Biocontrol Effects on Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol (DON) Accumulation by DON-Degrading Bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 toxins	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins12060399	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 森村 洋行、佐藤 育男	4. 巻 12月臨時増刊号
2. 論文標題 かび毒デオキシニバレノールの分解微生物とコムギ赤かび病の防除	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 85-88
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 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 -

1. 著者名 Morimura Hiroyuki, Uesaka Kazuma, Ito Michihiro, Yoshida Shigenobu, Koitabashi Motoo, Tsushima Seiya, Sato Ikuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Deoxynivalenol-Degrading Actinomycete Nocardioides sp. Strain LS1, Isolated from Wheat Leaves in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01650-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01650-18	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Morimura H., Chiba S., Takemoto D., Kawakita K. and Sato I.
2. 発表標題 Three novel deoxynivalenol-degrading bacteria isolated from Poaceae planted soils in Japan.
3. 学会等名 International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤育男
2. 発表標題 デオキシニバレノール分解微生物の探索と活用の可能性
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Morimura, Sotaro Chiba, Daigo Takemoto, Kazuhito Kawakita, Ikuo Sato
2. 発表標題 Novel deoxynivalenol-degrading microorganisms isolated from Poaceae planted soils
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森村洋行、千葉壮太郎、竹本大吾、川北一人、佐藤育男
2. 発表標題 イネ科植物根圏土壌からの新規デオキシニバレノール分解細菌の分離と機能解析
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森村洋行・千葉壮太郎・竹本大吾・川北一人・佐藤育男
2. 発表標題 Isolation of novel deoxynivalenol-degrading microorganisms from Poaceae planted soils
3. 学会等名 International Symposium on Innovative Crop Protection for Sustainable Agriculture (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森村洋行・伊藤通浩・吉田重信・對馬誠也・千葉壮太郎・竹本大吾・川北一人・佐藤育男
2. 発表標題 かび毒デオキシニパレノール分解細菌を用いたコムギ赤かび病の発病抑制効果の検討
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2018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