

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02954

研究課題名(和文) 有用根圏細菌処理により植物に誘導される青枯病菌排除現象の分子機構解明

研究課題名(英文) The molecular mechanisms underlying bacterial wilt pathogen elimination from host plants with antagonistic rhizobacterial treatment

研究代表者

清水 将文 (Shimizu, Masafumi)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60378320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Mitsuaria sp. TWR114とRalstonia sp. TCR112を混合処理したトマト苗では、硝酸輸送に関わる遺伝子の発現が特徴的に誘導された。さらに、導管液中の硝酸濃度が著しく低下した。しかし、混合処理トマトの導管液中では青枯病菌の増殖は抑制されなかったことから、硝酸濃度の低下と青枯病菌排除現象との関連性は見いだせなかった。一方、ゲノム解析から、両細菌株とも青枯病菌と類似のエフェクターをコードする遺伝子や各種抗菌物質の生合成遺伝子を保有していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、拮抗微生物による植物病害防除のメカニズムに関する新しい知見を提供するものであり、植物病理学的に重要である。また、本研究では、天然単糖であるアラビノースを植物根に処理すると青枯病が抑制されることを副次的に発見したが、この成果は低環境負荷型の新規病害防除剤の開発に繋がる可能性があり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In tomato seedlings treated with a mixture of Mitsuaria sp. TWR114 and Ralstonia sp. TCR112, expression of genes related to nitrate transportation was characteristically induced. Furthermore, the nitrate concentration in xylem sap of the mixed-treated tomatoes was significantly reduced compared to the control tomatoes. However, since the growth of bacterial wilt pathogen in the xylem sap of the mixed-treated tomatoes was similar with that of the control tomatoes, we could not find a relationship between the decreased nitrate concentration and the bacterial wilt pathogen elimination. On the other hand, genome analysis of TWR114 and TCR112 revealed that both bacterial strains possess genes encoding effectors similar to those of bacterial wilt pathogen and genes for the biosynthesis of various antimicrobial substances.

研究分野：植物病理学

キーワード：青枯病菌排除 根圏細菌 生物防除

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壌伝染性の *Ralstonia solanacearum* 種複合体による青枯病は、ナス科野菜に深刻な被害をもたらす難防除の重要病害である。研究代表者らは、青枯病に対する新規バイオコントロール法の開発を目的に拮抗細菌の探索を行い、トマト青枯病の発生を顕著に抑制する根圏細菌 *Mitsuraria* sp. TWR114 株および *Ralstonia* sp. TCR112 株を発見することに成功した。さらに、これら 2 菌株の細菌を混合すると相乗効果が生まれ、1 回の灌注処理で少なくとも 1 ヶ月以上は発病を抑制できることも発見した。根圏土壌中の青枯病菌密度を測定したところ、TWR114 株と TCR112 株の単独処理区と混合処理区の間で差が認められなかったため、根への感染抑制が相乗効果の原因ではないと推定された。一方で、茎内の青枯病菌密度を調べた結果、単独処理区では接種から日数が経過するに伴い徐々に上昇するのに対して、混合処理区では一旦上昇するものの数週間以内には検出限界以下にまで低下することが明らかとなった。このことから、トマト茎内からの青枯病菌の排除が TWR114 株と TCR112 株の混合処理による相乗的青枯病防除効果の原因であると考えられた。拮抗細菌やその他の資材の処理で青枯病菌が植物体内から排除されるという現象はこれまで報告された例がないことから、その機構解明は植物病理学的に極めて意義あるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、2 種の根圏細菌 (TWR114 株と TCR112 株) を根に混合処理することで、植物の地上部から青枯病菌が排除される仕組みを分子レベルで解明し、植物の潜在的な青枯病抵抗性の理解につながる知見を得ることである。そのため、本研究課題では、TWR114 株と TCR112 株を混合処理した植物体内における青枯病菌の動態や遺伝子発現変動を詳細に解析するなどして、青枯病菌排除に関与する防御応答の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 植物体内における青枯病菌の挙動解析

根圏細菌 2 株を単独 / 混合処理したトマト苗と抵抗性誘導作用をもつ L-ヒスチジンを処理したトマト苗に青枯病菌を灌注接種した後、経日的にサンプリングを行い、茎内の青枯病菌密度を測定した。

蛍光性タンパク質遺伝子を導入した根圏細菌および青枯病菌を作成し、植物体内での挙動を共焦点レーザー顕微鏡で解析する。

(2) RNA-seq による比較トランスクリプトーム解析

根圏細菌 2 株を単独 / 混合処理したトマト苗と抵抗性誘導作用をもつ L-ヒスチジンを処理したトマト苗に青枯病菌を灌注接種した後、経日的にサンプリングを行い、茎内での遺伝子発現を RNA-seq により解析した。

(3) 導管液中の硝酸濃度測定

根圏細菌 2 株を単独処理および混合処理したトマト苗から導管液を回収し、イオンクロマトグラフを用いて硝酸濃度を測定した。

(4) 導管液中での青枯病菌の増殖の比較

根圏細菌 2 株の単独 / 混合処理トマト苗から回収した導管液に青枯病菌を接種し、好気条件および嫌気条件で培養した。培養後、プレートリーダーを用いて青枯病菌の細胞密度を測定した。

(5) 根圏細菌のゲノム解析

TWR114 株と TCR112 株からゲノム DNA を抽出し、Ion PGM シークエンサーを用いてゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 植物体内における青枯病菌の挙動解析

根圏細菌を混合処理したトマト苗の茎内では、青枯病菌接種 9~11 日に菌密度が急激に低下し、検出限界以下にまで低下することが明らかとなった。一方、根圏細菌の単独処理区および抵抗性誘導剤である L-ヒスチジンを処理したトマトでは菌密度が徐々に上昇し、やがてトマト苗が枯死した。

(2) RNA-seq による比較トランスクリプトーム解析

青枯病菌接種 10 日後に茎組織を採取して RNA-seq をおこない、PCA 解析に供与した。その結果、第一主成分として病勢進展に伴う応答、第二主成分として細菌 (病原菌または根圏細菌) の感染に伴う応答を検出することができた (図 1)。さらに RNA シークエンスデータを詳細に解析

し、青枯病排除現象に関わると予想される遺伝子の洗い出しを行ったところ、混合接種区では200以上の遺伝子が無処理区よりも発現量が増加しており、うち148遺伝子が拮抗細菌の単独接種区およびL-ヒスチジン処理区では発現変動の見られない遺伝子であることが明らかとなった。それらの遺伝子の大半がペプチドや硝酸の輸送に関わる遺伝子であった。

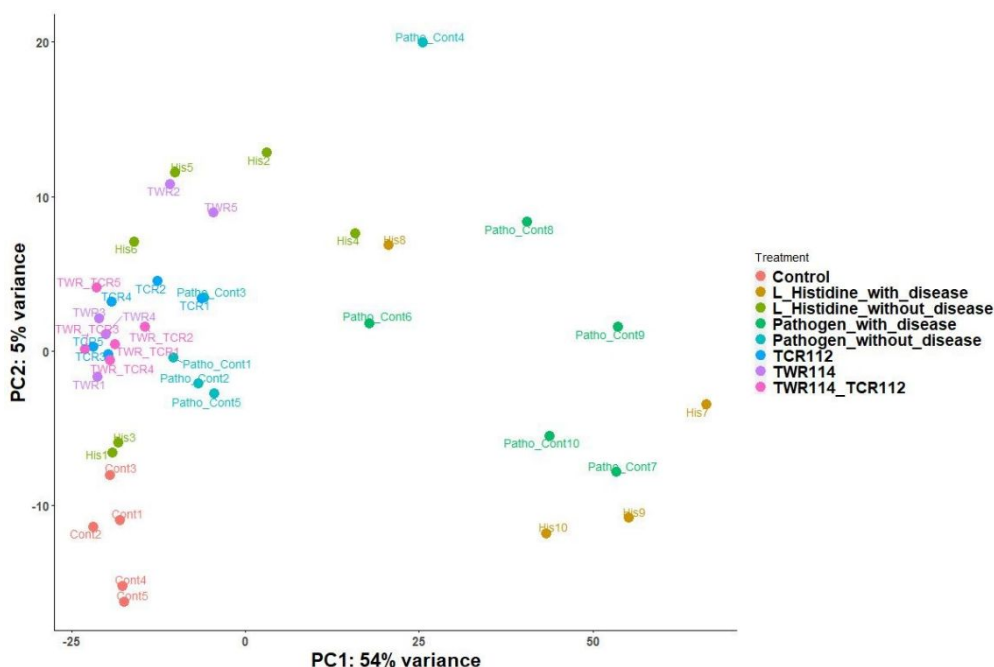


図1 RNA-seq データの PCA 解析結果

(3) 導管液中の硝酸濃度測定

無処理対照区のトマト苗に比べて、根圏細菌の単独処理区ではいずれも導管液中の硝酸イオン濃度が上昇していた(図2)。一方で、根圏細菌の混合処理区では対照区と単独処理区よりも有意に硝酸イオン濃度が低下していた。

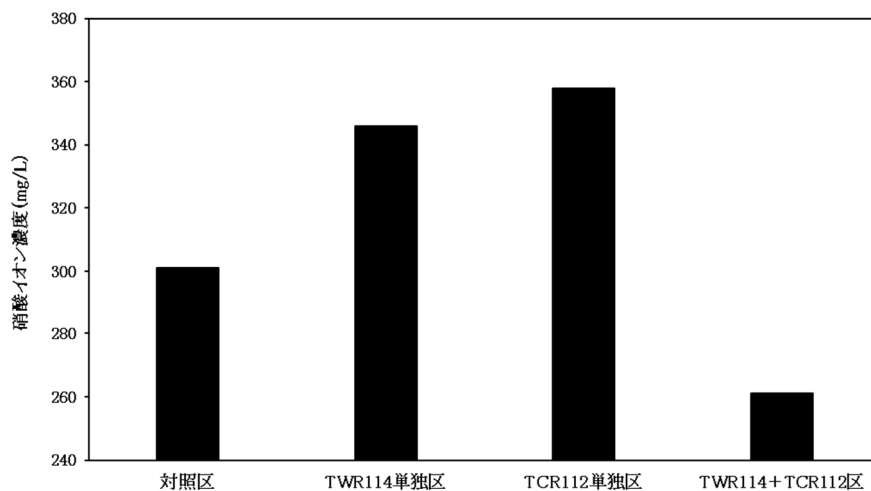


図2 根圏細菌処理したトマト苗の導管液の硝酸イオン濃度

(4) 導管液中での青枯病菌の増殖の比較

無処理区、根圏細菌の単独および混合処理区のトマト苗から回収した導管液内での青枯病菌の増殖を比較したが、好気条件および嫌気条件のいずれにおいても処理区間で差は認められなかった。

(5) 根圏細菌のゲノム解析

ゲノム解析の結果、TWR114株とTCR112株のどちらも新種の細菌であることが判明した。また、両細菌株とも病害抑制効果に関与すると推定される複数の抗菌性タンパク質や抗生物質、シデロフォアなどの生合成遺伝子を保有している他、青枯病菌がもつエフェクター遺伝子と相同性の高い遺伝子を2つずつ保有していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Marian Malek, Fujikawa Takashi, Shimizu Masafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome analysis provides insights into the biocontrol ability of Mitsuaria sp. strain TWR114	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-021-02327-1	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 Fu Hui-Zhen, Marian Malek, Enomoto Takuo, Suga Haruhisa, Shimizu Masafumi	4. 巻 35
2. 論文標題 Potential Use of L-arabinoose for the Control of Tomato Bacterial Wilt	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME20106	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 青枯病防除剤及び青枯病の防除方法	発明者 清水将文、マレク・カレド・マームード・マリアン	権利者 国立大学法人東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-083556	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 植物病害防除剤及び植物病害の防除方法	発明者 清水将文、マレク・カレド・マームード・マリアン	権利者 国立大学法人東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/17610	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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	山本 義治 (Yamamoto Yoshiharu) (50301784)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石賀 康博 (Ishiga Hiroyasu) (50730256)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	
研究分担者	別役 重之 (Betsuyaku Shigeyuki) (80588228)	龍谷大学・農学部・准教授 (34316)	

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