

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380199

研究課題名（和文）遺伝子情報を基盤とする生物農薬農薬評価システムの再構築

研究課題名（英文）Reassessment by Genotypic characterization of microbial biocontrol agents isolated from diverse Agro-ecosystems

研究代表者

土屋 健一（TSUCHIYA KENICHI）

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：40150510

研究成果の概要（和文）：植物病害の生物的防除用微生物素材として、根圏、葉鞘、植物体内から細菌群を分離し、分子系統解析に基づく分類・同定ならびに特性評価を行った。シュードモナス属およびパークホルデリア属を中心に、抗生作用、抗菌物質遺伝子、生育促進作用等の有用特性について検証するとともに、人畜関連系統との血清型別、伝染系統マーカー遺伝子の存否等の比較解析により潜在的リスク特性を検証することで、微生物農薬素材の評価システムの再構築に関する基礎的知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：Exploration and characterization of various genera of rhizospheric, epiphyte, and endophytic bacteria as candidates for Microbial biological control agent (MBCA) of plant diseases were conducted. Selected bacterial species was analyzed molecular biologically, serologically and genetically. Based on the results useful informations were provided for reassessment of benefits and/or risks of MBCAs.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,400,000  | 1,920,000 | 8,320,000  |
| 2010年度 | 3,200,000  | 960,000   | 4,160,000  |
| 2011年度 | 2,600,000  | 780,000   | 3,380,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 12,200,000 | 3,660,000 | 15,860,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：根圏細菌，抗菌性物質，内生細菌，葉面細菌，生物的防除，病原性因子，リスク評価

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 環境保全型持続的農業が指向される中で、有効な微生物農薬の開発研究ならびに利用が求められている。一方、自然環境に生息する微生物に由来する生物農薬素材のスクリーニングにおいて、植物病原菌に対する抗生作用や生育促進性、および抗菌物質の産生遺伝子などの有用特性の評価が一義的であり、人畜に対する潜在的リスクについての一次評価はほとんどなされていない。

(2) 植物の土壌病害を中心とする微生物農薬の有効性を左右する条件として、定着の安定性が不可欠であり、その対策の一つとして微生物素材の探索源の検証が必要である。近年、植物内生菌や表面生息菌などの新たな微生物素材への注目が高まっており、それらの微生物が有する有用特性を評価することにより新たな微生物農薬素材の発掘と、適用範囲の拡大が期待されている。

## 2. 研究の目的

(1) 生物農薬としての微生物素材の探索源として、従来、難防除病害としての土壌病害を対象として、これまで多くの研究により標的とされた植物根圏（土壌、植物根面）に加えて、植物体の表面（葉面、葉鞘等）および植物体内（植物組織）に注目し、新たな生態系ニッチに生息する有用微生物素材の発掘を検討した。

(2) その一方で、農業生態系を、環境微生物と病原微生物との遭遇接点の場という視点から捉え、植物根圏細菌や内生細菌として分離されるシュードモナス属細菌等の微生物農薬素材について、抗生作用や生育促進作用（PGP）および抗菌物質産生性、およびそれらに関連する遺伝子の検索などの有用特性の評価とともに、人畜に対する病原性関連遺伝子の存在等の潜在的危険性を指標とした便益とリスクの両面からの検証を通じて、微生物農薬素材の評価法の再構築を図るための基礎知見の集積を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 各種植物の根圏、葉面、および組織内等からの細菌の探索・収集と保存：国内各地から収集した栽培作物から、根圏細菌、葉面（葉鞘）生息菌、内生細菌を、また各種有機資材施用圃場から土壌サンプルを、それぞれ各種選択培地等を用いて分離をおこなった。分離細菌株は純化したのち、凍結保護剤を用いて $-20\sim 40^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で中長期保存した。

(2) 素材分離細菌の分類学的系統解析：蛍光性シュードモナス属等、分離された細菌群の種同定は、16S rDNAの塩基配列の基準菌株との相同性解析に基づいて行った。またバークホルデリア属（セパシア菌群）では、*recA*、*flhC*等のDNAマーカーを指標としたPCR-RFLP解析により、Genomovar (Gv. 遺伝子型)の判別を行った。さらに各Gv.に対する抗血清を作製し、それらを用いて血清型判別を行い、臨床系統株と環境由来株との関連性について検討した。

(3) 抗菌作用、抗菌物質産生遺伝子の検索と有用特性評価：蛍光性シュードモナス等の有用特性として、各種植物病原菌に対する*in vitro*での抗生作用を検討した。また、フログルシノール（DAPG、Ph1）、ピロールニトリン（Prn）およびピオルデオリン（Plt）等の抗菌物質の産生性関連遺伝子に特異的なプライマーを利用してPCRによる同遺伝子の増幅を行い、その存否を検索した。

(4) 分離細菌の潜在的リスク解析：バークホルデリア属のセパシア菌群について、溶血素

(hemolysin)産生性、およびヒト伝染系統マーカー遺伝子（*esmR*）などの病原性関連因子の存在について、血液含有培地での培養、または特異検出プライマーを用いたPCR法により検索を行った。

(5) その他の特性評価解析：イネ・ムギ葉鞘生息細菌、野生ナス植物、接ぎ木トマト等からの内生細菌については、微生物の菌体密度認識機構であるクオラムセンシング（quorum sensing）のオートインデューサーで、グラム陰性細菌のシグナル分子であるアシル化ホモセリンラクトン（AHL）の産生性または分解性について、それぞれ指標細菌を用いて検索を行うとともに、生育促進に関わる物質として、インドール酢酸（IAA）産生性等についても検討した。

## 4. 研究成果

(1) 国内各地の各種作物の根圏土壌から、選択培地および血清学的手法（エライザ法）を用いて多数の蛍光性シュードモナスおよびバークホルデリア等の細菌の分離・収集を行った。それぞれ数百菌株を $-20\sim 40^{\circ}\text{C}$ で保存し、以後の試験に供するとともに、生物的防除素材の遺伝資源として保存した。またイネおよびコムギの葉鞘生息細菌ならびに野性ナス属植物根あるいはトマト接木組織からそれぞれ内生細菌を分離し、同様に保存に供した。

(2) 根圏由来の蛍光性シュードモナス等の分離細菌株については、いずれも16S rDNA塩基配列解析により、属または種レベルで同定し、分子系統解析を行った。なかでも、イネおよびコムギの葉鞘生息分離細菌株はいずれも幅広い多様性が認められ、前者では*Sphingomonas*、*Microbacterium*、*Acidovorax*属等が、後者では*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*および*Pseudomonas*属菌がそれぞれ優先菌群であった。一方、トマト接木苗から分離された内生細菌では約20属の存在が認められた。バークホルデリア属（セパシア菌）においては、*recA*遺伝子等を指標にした遺伝子型（Genomovar:Gv）の判別の結果、4県の畑土壌から分離した菌株のうち約100菌株が同菌群と同定され、それぞれGv. I、II、III-A、III-B、V、およびIXの6型の存在が確認されたが、各Genomovarの分布は圃場により異なった。各Gv.の代表菌株に対して作製された抗血清を用いて、臨床由来株と環境由来株におけるGv型別と血清型別との関連性について検討した結果、環境由来株と臨床株にそれぞれ優先的なGv. IおよびGv. IIIを、それぞれのGv.対応抗血清を利用して識別することが可能であり、同種細菌のリスク評価への適用性が示唆された。



H., Ikeda, T. and Tsuchiya, K. Diversity of culturable chitinolytic bacteria from rhizosphere of agronomic plants in Japan. *Microbes and Environmental Biotechnology*, 26:7-14, 2011. 査読有

[学会発表] (計 31 件)

- ①松隈弓子、岩本有紀子、古屋成人、橋本好弘、染谷信孝、竹下 稔、土屋健一. 査読有、生物的防除素材細菌 *Pseudomonas fluorescens* LRB3W1 株に対する特異抗体の作製と検出への利用. 日本植物病理学会大会、2012. 3. 30、福岡国際会議場
- ②城野隆宏、古屋成人、松隈弓子、竹下 稔、Hoang Hoa Long、黒瀬大介、土屋健一. トマト青枯病の生物的防除素材としての内生細菌の選抜日本植物病理学会大会、2012. 3. 30、福岡国際会議場
- ③Tanabe, N., Ueya, Y., Shiratsuchi, S., Yoshida, M., Furuya, N., Niwa, R., Yoshida, S., Tsuchima, S. and Tsuchiya, K. Bacterial community structure on leaf sheath of wheat and their characterization as biocontrol agents. The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium (第 2 回日韓合同シンポジウム)、2012. 3. 27、福岡国際会議場
- ④Matsuguma, Y., Hashimoto, Y., Someya, N., Furuya, N., Takeshita, M. and Tsuchiya, K. Production and application of specific antiserum for detection of a biological control agent, *Pseudomonas fluorescens* LRB3W1, in tomato plant. The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium、2012. 3. 27、福岡国際会議場
- ⑤Shirono, T., Furuya, N., Matsuguma, Y., Takeshita, M., Hoang, H. L. and Tsuchiya, K. Properties of endophytic bacteria isolated from tomato as biocontrol agents. The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium、2012. 3. 27、福岡国際会議場
- ⑥Hoang, H., Furuya, N., Yoshimoto, S., Takeshita, M., and Tsuchiya, K. The nature of induced resistance by an endophytic *Pseudomonas* sp. to bacterial wilt of tobacco. 日本植物病理学会九州部会、2011. 11. 9、大分県労働福祉会館
- ⑦Matsuguma, Y., Nwe, L., Hoang, H. L., Takeshita, M., Someya, N., Furuya, N., Hashimoto, Y. and Tsuchiya, K. Detection and population dynamic analysis biological control agent *Pseudomonas fluorescens* LRB3W1 in tomato plants from the 'Live coating seed'. APS-IPPC Joint Meeting (アメリカ植物病理学会-国際植物保護会議合同学会)、2011. 8. 7、ホノルル市

(アメリカ合衆国)

- ⑧Hoang, H. L., Furuya, N., Takeshita, M. and Tsuchiya, K. Biocontrol of bacterial wilt of tobacco via induced resistance by endophytic bacteria. APS-IPPC Joint Meeting、2011. 8. 7、ホノルル市 (アメリカ合衆国)
- ⑨Hoang H. L., Furuya, N., Takeshita, M. and Tsuchiya, K. Biocontrol of bacterial wilt of tobacco caused by *Ralstonia solanacearum* using plant growth promoting endophytic bacteria. 平成23年度日本植物病理学会、2011. 3. 29、東京農工大学府中キャンパス
- ⑩城野隆宏、古屋成人、松隈弓子、竹下稔、Hoang H. Long、黒瀬大介、土屋健一、トマト接木苗から分離された内生細菌の生物的防除素材としての性状解析、2011. 3. 29、東京農工大学府中キャンパス
- ⑪田辺尚子・古屋成人・吉田満明・江藤圭介・吉田重信・對馬誠也・土屋健一、イネ葉鞘上に生息する細菌の群集構造と生物的防除素材の探索、2011. 3. 27、東京農工大学府中キャンパス
- ⑫土屋健一・亀崎友加・松隈弓子・對馬誠也・古屋成人、Genomovar を異にする *Burkholderia cepacia* complex 系統の血清型別について. 日本土壌微生物学会2010年度大会、2010. 5. 21、東京大学農学部
- ⑬松隈弓子・古屋成人・橋本好弘・土屋健一 血清学的手法を用いた生物農薬素材微生物の動態解析. 日本土壌微生物学会 2010 年度大会、2010. 5. 21、東京大学農学部
- ⑭Matsuguma, Y., Furuya, N., Kurose, D., Hashimoto, Y., and Tsuchiya, K., Application of serological methods for detection and population dynamic analysis of biological control agents in plants from 'Live coating seed'. The 12th International Conference Plant Pathogenic Bacteria (ICPPB). 2010. 6. 10 レ・ユニオン市 (フランス)

[図書] (計 1 件)

- ①土屋健一ら、文永堂出版、植物病理学、2010、265-272

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土屋 健一 (TSUCHIYA KENICHI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：4 0 1 5 0 5 1 0

### (2) 研究分担者

古屋 成人 (FURUYA NARUTO)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10211533  
竹下 稔 (TAKESHITA MINORU)  
九州大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：00304767

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

對馬誠也 (TSUSHIMA SEIYA)  
(独) 農業環境技術研究所  
染谷信孝 (SOMEYA NOBUTAKA)  
(独) 農研機構北海道農業研究センター  
松隈弓子 (MATSUGUMA YUMIKO)  
九州大学・大学院農学研究院・大学院生