

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 6月12日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780059

研究課題名（和文） 植物生育促進菌類とマメ科植物の応答機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of responses of legume plants to plant growth-promoting fungi

研究代表者 増中 章 (MASUNAKA AKIRA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター 畑作研究領域
任期付研究員

研究者番号：80466010

研究成果の概要（和文）：供試した植物生育促進菌類のうちトリコデルマ菌のみがマメ科のモデル植物であるミヤコグサの根圏域に長期にわたり定着する能力を有し、ミヤコグサの生育を促進することを明らかにした。これは、本菌がミヤコグサの抵抗性反応である抗菌性物質ファイトアレキシンの生産を生合成遺伝子の発現段階から抑制し、ファイトアレキシン生産を制御しているためであることを示した。

研究成果の概要（英文）：When PGPF including *Trichoderma koningi*, *Fusarium equiseti*, and *Penicillium simplicissimum* were inoculated onto *L. japonicus* roots, only *T. koningi* colonized the roots long-term and increased plant dry weight (126%). Roots colonized by *T. koningi* and the induction of a plant defense response were also revealed. These studies demonstrated that *T. koningi* possesses the ability to suppress the transcription of genes involved in biosynthesis of phytoalexins, and it made *T. koningi* possible to colonize in the rhizosphere.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学、土壌学

キーワード：生育促進菌類

1. 研究開始当初の背景

現在の各種肥料原料の著しい高騰の中、減肥技術の開発につながるような「微生物による植物の生育促進現象」についての情報はホルモン物質関連以外は皆無に等しく、各遺伝子の発現に基づいた植物体内の代謝プロファイル解析が望まれていた。近年では、モデル植物を中心としたゲノム情報の蓄積により、物質代謝、シグナル伝達等の植物の基本

的なメカニズムを遺伝子レベルで解析することが可能となってきた。申請者は、根圏微生物であり、植物の生育を促進する菌類（PGPF：Plant Growth-Promoting Fungi）が、マメ科のモデル植物であるミヤコグサに対しても菌接種後2週間で植物体の乾燥重量が2割増加、3週間後では4割増加するなどの生育促進効果があることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

生育促進菌類 (PGPF) が有する植物生育促進因子を明らかにし、植物の生育促進応答をモデル植物を用いて遺伝子レベルで解析することによって、PGPF による植物体内の代謝プロファイルの変化を解析することを目的とする。

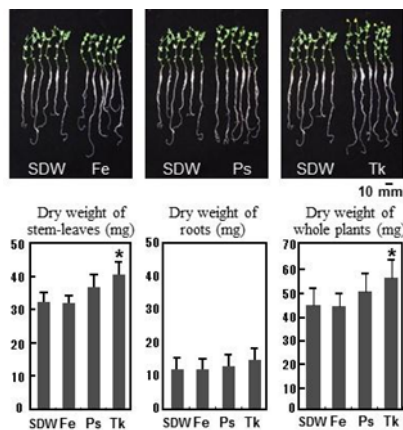
3. 研究の方法

まずミヤコグサに対して 5 種類の PGPF (非病原性フザリウム菌, ペニシリウム菌, 3 種類のトリコデルマ菌) のミヤコグサに対する生育促進効果を明らかにする。次に生育促進効果を示した菌類の根内外での動態を顕微鏡下によって解析する。さらに、生育促進効果を示した菌類に対するミヤコグサの応答反応を、マメ科植物の重要な抵抗性機構であるファイトアレキシン合成に関与する遺伝子の発現をノーザン解析することによって明らかにする。また実際に根から分泌されるファイトアレキシンを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析することによって生合成遺伝子発現との相関性を証明する。

4. 研究成果

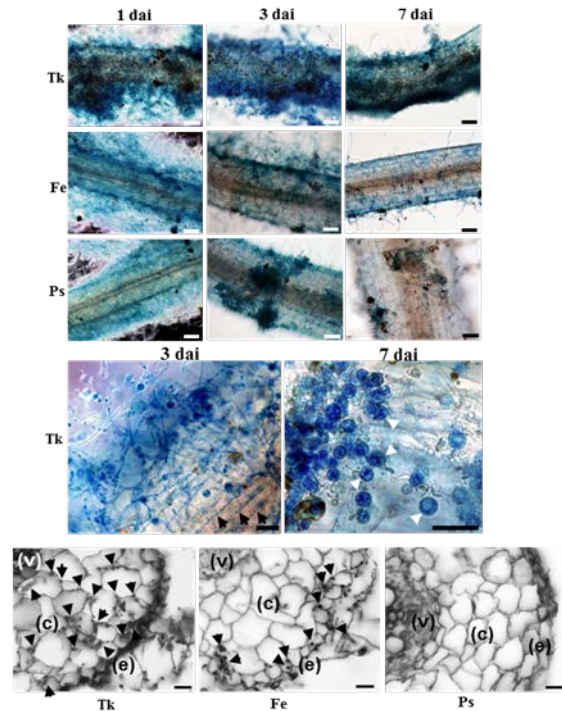
(1) PGPF のマメ科モデル植物ミヤコグサに対する生育促進効果の検証

ミヤコグサに対して、PGPF (非病原性フザリウム菌, ペニシリウム菌, トリコデルマ菌) のうち、トリコデルマ菌 (*Trichoderma koningii*; Tk) のみが乾物量で約 126% の生育促進効果を示すが、非病原性フザリウム菌 (*Fusarium equiseti*; Fe)、ペニシリウム菌 (*Penicillium simplicissimum*; Ps) と他のトリコデルマ菌 (*T. harzianum*) は効果を示さないことを明らかにした。



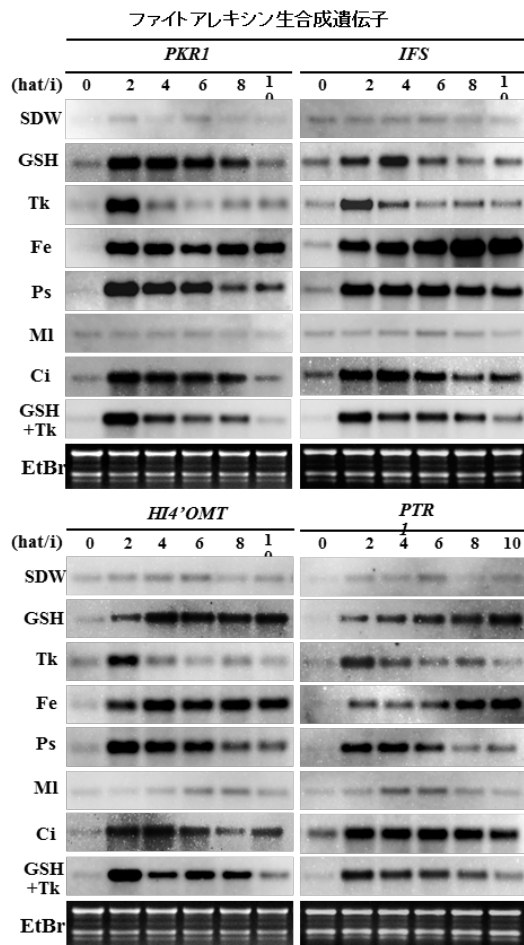
(2) 根内外における PGPF の動態解析

PGPF のミヤコグサの根内外における定着を顕微鏡を用いて解析した結果、生育効果を示した *T. koningii* のみが長期間にわたり根表面に定着し続けられることを明らかにした。また、*T. koningii* は長期にわたり定着するための耐久体 (yeast-like cell) に形態変化することを突き止めた。さらに根内への菌糸の侵入を感染根の薄切り切片を作成して解析したところ、*T. koningii* のみ根の内部組織にまで入り込み、定着することを明らかにした。



(3) *T. koningii* に対するミヤコグサの応答反応

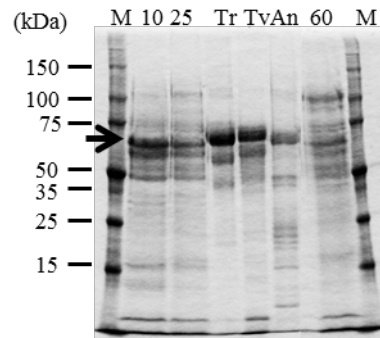
PGPF 接種時のミヤコグサの応答反応について、ファイトアレキシン合成遺伝子の発現を解析したところ、*T. koningii* のみが生合成遺伝子の発現を速やかに抑制することを突き止めた。また同様に根からのファイトアレキシン分泌も抑制していた。これらのことから、*T. koningii* は、ミヤコグサの重要な抵抗性機構であるファイトアレキシン合成を遺伝子レベルで制御することで、根圏域への長期定着を可能にしていることを明らかにした。



SDW: 滅菌水, GSH: 還元型グルタチオン(エリシター), Tk: *T. koningii*, Fe: *F. equiseti*, Ps: *P. simplicissimum*, MI: *Mesorhizobium loti*, Ci: *Calonectria ilicicola*, EtBr: エチプロ染
色rRNA

(4) 根圏域定着関連因子の探索

根内へ侵入するために必要であると考えられるセルラーゼの生産性解析と本酵素をコードする遺伝子の単離を行った結果、*T. koningii* の有するセルラーゼ遺伝子は、*T. viride* や *T. longibrachiatum* などトリコデルマ属菌の endoglucanase I 遺伝子と非常に高い相同性を示すことを明らかにした。また培養ろ液からの粗抽出セルラーゼを SDS-PAGE により分離した結果、検出された主なタンパク質は、*T. reesei* や *Aspergillus niger* の生産する主なセルラーゼに近いサイズを示した。今後、本セルラーゼが根への感染時にどのように関連しているのかさらに詳細に調べる必要がある。



Lane; M, 分子量マーカー; 10, *T. koningii* 10日間の培養ろ液からの粗抽出物; 25, 25日間の培養ろ液からの抽出物; Tr, *T. reesei*由来のセルラーゼ(Sigma); Tv, *T. viride*由来のセルラーゼ(Sigma); An, *Aspergillus niger*由来のセルラーゼ(Sigma); 60, 60日間の培養ろ液からの粗抽出物。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Masunaka, A., Hyakumachi, M., and Takenaka, S. Plant Growth-Promoting Fungus, *Trichoderma koningii* Suppresses Isoflavonoid Phytoalexin Vestitol Production for Colonization on/in the Roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ.* 査読あり. 2011.26:128-134
doi:10.1264/jsme2.ME10176

[学会発表] (計 3 件)

- ① 増中 章, 百町満朗, 高橋秀樹, 竹中重仁, Plant responses to biocontrol fungi and plant growth-promoting fungi, Asian Mycological Congress 2011 and 12th International Marine and Freshwater Mycology Symposium (招待講演) 2011年、8月9日、インチョン大学。
- ② 増中 章, 百町満朗, 竹中重仁, 植物生育促進菌類(PGPF)のマメ科モデル植物ミヤコグサ根への定着性、土壤微生物学会大会、2009年6月13日、福岡大学。
- ③ 増中 章, 百町満朗, 竹中重仁, 植物生育促進菌類(PGPF)のマメ科モデル植物ミヤコグサに対する生育促進効果、土壤微生物学会大会、2008年6月13日、静岡大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増中 章 (MASUNAKA AKIRA)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・北海道農業研究センター・畑作研究領
域・任期付研究員

研究者番号：80466010