

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580059

研究課題名(和文) 生物防除微生物による単子葉作物の病害抵抗性誘導機構

研究課題名(英文) Mechanism of induced resistance of a monocot crop by biocontrol agent

研究代表者

長谷 修 (HASE, Shu)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10261497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：卵菌類の生物防除微生物であるピシウムオリガンドランは、双子葉植物に対して病害抵抗性を誘導する能力があり、その誘導機構は明らかにされている。本研究は、新たにイネで解析することで、単子葉を含めた主要作物全般における抵抗性誘導機構の特徴を明らかにすることをねらいとした。その結果、P0はイネの種子伝染性の細菌病を抑制できることを明かにした。また、双子葉植物と共通してジャスモン酸の情報伝達系を介した防御反応を活性化することが考えられた。誘導機構の解明は、広範囲の作物を対象にした生物防除の学際的かつ農学的な研究の発展に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Biocontrol agent, *Pythium oligandrum* (P0), has an ability to activate jasmonic acid (JA)-mediated induced resistance against pathogens in dicot plants. To elucidate the ability of P0 in monocot plants, I studied the induction of defense gene expression in rice treated with P0, and the induced resistance to pathogens. The global gene expression analysis of the roots treated with the elicitor of P0 indicated that the elicitor enhanced expression of JA-inducible genes. The expression of the JA-responsive defensive genes was also enhanced in hastened seeds treated with P0. Treatment of seeds with the oospore suspension following inoculation with a bacterial pathogen significantly reduced disease severity of the seedling rot as compared with an untreated control. These findings suggest that P0 seems to activate JA signaling-mediated defense reaction and induce resistance against the infection of bacterial pathogens in rice.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 誘導抵抗性 生物防除微生物 イネ

1. 研究開始当初の背景

植物病害の抵抗性誘導機構を活性化する農薬は、耐性菌が出ないため優れた防除技術であると言われている。プロペナゾール (PBZ) はイネいもち病防除剤の有効成分で、30年以上使用されているが耐性菌は出ていない。PBZの作用機構は、全身獲得抵抗性 (SAR) と呼ばれるタイプを活性化することである。SARはサリチル酸 (SA) の情報伝達系に依存し、SA誘導性の防御関連遺伝子の発現を伴うことが特徴である。

一方、生物防除微生物と称する非病原性の菌類や細菌類も植物の抵抗性誘導機構を活性化する。最初に報告されたのは、根圏生息性の非病原性細菌を混和した土壌で育成したシロイヌナズナが病原細菌に対して抵抗性を誘導する系である。このタイプは情報伝達系がジャスモン酸 (JA) とエチレン (ET) に依存したことから、SARとは区別され全身誘導抵抗性 (ISR) と呼ばれている。この研究は生物防除微生物による抵抗性誘導機構解明研究の先駆けとなり、また、本細菌とある系統はトマト病害の微生物農薬として登録された経緯がある。

卵菌類のピシウムオリガンドラン (*Pythium oligandrum*: 以下、P0 と略す) には非病原性でありながら植物の根圏に定着して土壌伝染性の病害を抑える能力がある。この作用機構は、病原菌への菌間寄生能力、病原菌との栄養物や空間の競合能力、あるいは抗菌性物質の産生能などいわれている。また、上記のような微生物間の直接的な拮抗関係の他に、P0は植物の防御反応を活性化することもわかってきた。これまでの研究では、P0はトマトとシロイヌナズナでJAとETの情報伝達系を介した抵抗性誘導機構を活性化し、病原細菌の感染を抑制することが明らかとなっている。またこの抵抗性誘導を活性化するタンパク性の因子がP0の細胞壁に存在することを見出し、CWP エリシターと称している。

P0の抵抗性誘導は、主に双子葉植物で見解析が進められてきた。しかし、P0菌は単子葉植物のコムギでも赤カビ病に対する抵抗性を誘導すると推察されている。また、一方、イネでも、PBZ I 遺伝子をふくむ複数の防御関連遺伝子の発現がエリシター処理によって誘導された。これらの知見は、遺伝子の発現レベルではP0菌がイネにおいても防御反応を活性化することを示唆している。そのため、広範囲の作物種を対象として解析し比較することは、P0菌をモデルとする生物防除微生物による抵抗性誘導機構の全容を解明する研究基盤を整えることができると考えられた。

2. 研究の目的

上述のように、P0菌は双子葉植物に加えて単子葉植物全般で抵抗性を誘導できる可能性が考えられた。そこで、本研究では、主に

遺伝子の転写レベルでP0菌によるイネの抵抗性誘導機構を解析し、その誘導機構と双子葉植物における機構との相関性を明らかにすることを目的とした。加えて、農学上重要なイネ病害に対する抵抗性誘導の可能性について接種試験により明らかにすることを目的とした。

本研究の代表的な成果として、P0を施用したイネにおいてイネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症の発生が抑制されるかを明らかにし、その抑制がP0施用による抵抗性誘導の発現に起因すると考察したことを中心に報告する。

3. 研究の方法

供試生物防除微生物は、北海道芽室のダイズ畑作土壌から分離した *Pythium oligandrum* Drechs. NITE P-619 (MMR2) 株を用いた。供試病原細菌には、農業生物資源研究所ジーンバンクのイネもみ枯細菌病菌 [*Burkholderia glume* (Kurita and Tabei 1967) Urakami et al. 1994 MAFF302437] を用いた。供試植物には、イネ (*Oryza sativa* L.) 品種‘はえぬき’ (山形県農業総合研究センター水田農業試験場より分譲) と品種‘日本晴’ (農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターより分譲) を用いた。種子は温湯浸漬滅菌した後、15°Cで3日間浸種し、続けて30°C明条件で20時間催芽処理を行った。催芽種子は、水耕液あるいはイネ用育苗培土に播種し、育苗した。水耕液は2倍希釈した春日井氏液を用いた。

P0の処理および発病試験は継のようにして行なった。すなわち、滅菌種子は一部をイネもみ枯細菌病菌液に浸漬して滅菌接種を行った。接種した種子は、細菌液を廃棄し、さらに滅菌蒸留水で3回洗い流した。続いて、接種種子の混入率が0%、10%、50%および100%になるように滅菌種子を混ぜて調整した40粒の種子をペトリ皿に入れて、滅菌蒸留水あるいはP0卵胞子懸濁液中で浸種と催芽処理を行った。催芽種子は90mlポット (深さ3cm) を用いてオートクレーブ処理したイネ育苗用培土に播種し、30°C恒温 (昼14時間) の人工気象器で発芽、緑化、および育苗した。なお、培土には1kg当たり複合肥料 (N:P:K=13:13:13) を1.5g混合した。発病調査は、発病指数0~3 (0;健全、1;健全より1葉期以上生育抑制、2;黄化、生育抑制、3:腐敗枯死苗および未発芽) を設定して、播種後9日目の苗について発病度 $=\Sigma$ (発病指数 \times 苗数) $\times 100 / (3 \times$ 総苗数) を算出した。試験は3反復実施した。

遺伝子の発現解析は、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法、あるいは21,500の遺伝子が搭載されたイネマイクロアレイによる網羅的な発現解析を行った。網羅的な発現解析では、‘日本晴’を用い水耕で育苗した3~4葉期の苗の根に2mg/mlのCWPあるいは滅菌蒸留水を浸漬処理した。4時間後

の根を試料とし、各処理区 100 mg、それぞれ 2 反復分を採取し、その試料から抽出した RNA を供試した。遺伝子の機能推定は、イネアノテーションプロジェクトデータベースに基づき行った。

4. 研究成果

(1) もみ枯細菌病菌接種イネ種子の苗腐敗症発病に対する P0 処理の効果：

発病度が高い条件では、P0 処理による発病抑制効果が発揮されにくいことが考えられる。そのため、イネもみ枯細菌病菌の接種種子の混入率を 10~100% の範囲で調整した試験区を設定した。試験区の種子は、それぞれ P0 卵胞子懸濁液あるいは滅菌蒸留水に浸種および催芽処理し、育苗培土に播種して苗腐敗症の発病を各処理区間で比較した。その結果、P0 処理区では、接種種子の混入率が 10%、50% および 100% のいずれの区でも、それぞれの同一混入率の滅菌蒸留水処理区に比べ発病が軽減された。また、発病度はいずれの P0 処理区でも有意に抑制され、発病抑制効果は混入率 100% の試料に比べて 10% あるいは 50% 混入区で高い傾向を示した (図 1)。

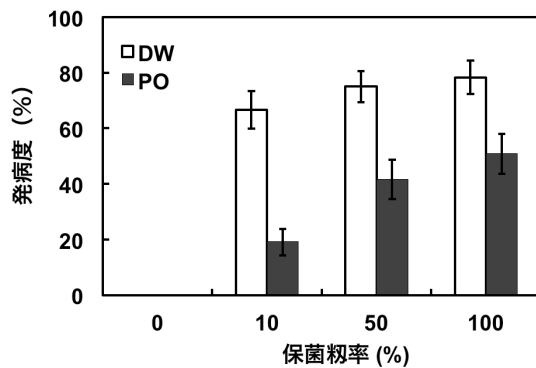


図 1 イネ苗腐敗症に対する *Pythium oligandrum* 処理の効果

(2) P0 処理イネ種子の幼芽における防御関連マーカー遺伝子 *OsPR10a/PBZ1* の発現解析：

発病試験と同じ条件で P0 卵胞子懸濁液中に浸種と催芽処理を行った種子について、*OsPR10a/PBZ1* の発現をノーザンブロット法により解析した。保菌種子の発病は、催芽から出芽期にかけての幼芽における細菌の増殖と関係することが報告されている。そこで、播種後 1 日目と 2 日目の幼芽部位における解析を行った。ただし、接種種子は含まなかった。また、種子を育苗培土に播種すると P0 の定着性や試料採取に影響することが考え

られたことから、その影響を省くため、水耕液に播種する試験区も設定した。さらに、水耕液に播種する試験区では、P0 の処理効果を高めるために、P0 を含む水耕液への播種による処理、ならびに P0 を浸種時と播種時の 2 回処理する区も設定した。一方、対照区は、滅菌蒸留水に浸漬した催芽種子を、育苗培土あるいは P0 を含まない水耕液に播種する区とした。その結果、水耕液に播種した試験区では、すべての P0 処理区において防御関連遺伝子 (*OsPR10a/PBZ1*) の発現が上昇した (図 2)。特に、P0 を浸種時と播種時に 2 回処理した区の発現が最も高かった。一方、育苗培土に播種した P0 処理区の幼芽でも、*OsPR10a/PBZ1* の発現は、反応が弱いものの播種後 1 日目で対照区に比べて上昇していた (図 2)。

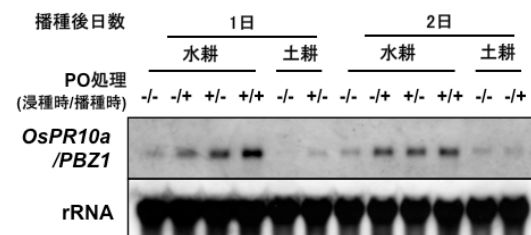


図 2 *Pythium oligandrum* 処理種子における防御関連遺伝子の発現解析

(3) P0 処理イネ苗根におけるジャスモン酸誘導性防御関連遺伝子の発現誘導：

P0 は根圏生息性であることから、卵胞子懸濁液をイネ苗の根に浸漬処理し、根における防御関連遺伝子の発現を経時的に解析した。その結果、図 3a に示すように、P0 処理区における *OsPR10a/PBZ1* の発現は、対照の滅菌蒸留水処理区に比べ浸漬後 4~24 時間で顕著に上昇しており、48 時間目には認められなかった。また、*OsPR10a/PBZ1* のパラログでジャスモン酸 (JA) 誘導性の *OsPR10b* や、JA 誘導性トマト *PR6/CEVI57* のオルソログである *OsPR6* の発現も、*OsPR10a/PBZ1* の発現パターンと同様に P0 処理区の浸漬後 4~24 時間で上昇し、48 時間目には認められなかった。

OsPR6 の JA に対する誘導性を確かめるため、イネ苗の根をメチルジャスモン酸 (MeJA) および SA に浸漬し、*OsPR6* の発現を解析した。その結果、*OsPR6* の発現量は 0.1 mM の MeJA 処理で増加したのに対し、3 mM の SA 処理では増加しなかった (図 3b)。よって、*OsPR6* はトマト *PR6/CEVI57* と同様に JA 処理に特異的に応答して、発現が誘導されることが確認された。

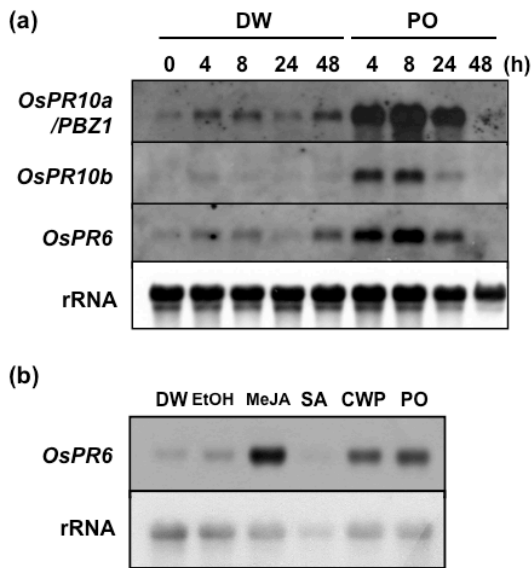


図 3 根における防御関連遺伝子の発現解析

(4)CWP エリシター処理イネ苗根の網羅的遺伝子発現解析：

PO 卵胞子懸濁液を施用したイネ苗根において、JA 誘導性 *OsPR6* 発現の誘導が確認されたことから、同卵胞子懸濁液から精製したCWP を苗の根に処理し、マイクロアレイを用いて、JA 応答性防御関連遺伝子を含めた遺伝子発現の変動を網羅的に解析した。CWP を処理したイネ苗の根において、*OsPR6* の発現が処理 24 時間後に誘導されていることを確認したのち (図 3b)、根における処理後 4 時間目の遺伝子発現変動を解析したところ、対照区の滅菌蒸留水処理に比べて 3 倍以上変動した遺伝子数が 60 あった。その中で、CWP 処理イネで発現が増加した遺伝子数は 45 であった。発現が増加した遺伝子の中には、先に解析した遺伝子の *OsPR10b*、*OsPR10a/PBZ1* および *OsPR6* も含まれており、それぞれ対照に比べて 7.71、4.63 および 3.93 倍の高い増加を示した。シグナル伝達に関連する遺伝子については、JA の生合成酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX) をコードする遺伝子が 4.84 倍に、アレンオキシド合成酵素 (AOS) をコードする遺伝子が 3.71 倍に増加した。一方、SA や ET のシグナル伝達に関わる遺伝子は、3 倍以上増加した遺伝子の中にはまったく含まれなかった。これらの結果から、PO 施用イネ苗においては、JA 応答性の防御関連遺伝子群の発現が顕著に誘導されていることが明らかになった。

また、CWP 処理で発現が増加した遺伝子群には、他にも *OsPR1* ファミリーの遺伝子 (*OsPR1#073*)、ペルオキシダーゼ (Prx) をコードする 3 遺伝子 (*OsPrx15*、*OsPrx70*、*OsPrx83*) ならびにジャーミン様タンパク質 (GLP) をコードする 2 遺伝子 (*OsGLP8-7*、*OsGLP12-1*) などの防御関連遺伝子が含まれていた。

一方、CWP 処理により発現が 1/3 以下に抑制された遺伝子数は 15 であり、機能が推定できた遺伝子数は 10 であった。この遺伝子群の中には、防御との関連性が考えられる *OsPrx71* やチオニンをコードする *Osthi1* が含まれていた。

(5) 考察

本研究から、イネもみ枯細菌病菌の感染による苗腐敗症は、イネ種子を PO 卵胞子懸濁液に浸種処理することにより抑制できることが明らかになった (図 1)。しかも、保菌率が高い条件でも抑制効果は認められた。本病は、保菌種子が催芽から出芽時に 30°C 程度の高温下にあると幼芽での細菌の増殖が活発になり発病する。本研究で実施した発病試験では催芽時から 30°C に設定したため、PO 卵胞子懸濁液の処理時期を細菌が増殖する前にしたことが発病抑制効果を発揮した要因の一つであると考えられた。また、PO 卵胞子懸濁液で浸種、催芽処理した種子の幼芽における *OsPR10a/PBZ1* の発現解析から、PO は少なくともイネ種子の発芽時から *OsPR10a/PBZ1* のような防御関連マーカー遺伝子の発現を誘導するものと考えられた。これらのことから、PO の浸種処理によるイネ苗腐敗症の発病抑制作用機構は、幼芽での防御システムの活性化によるものと推察された。

PO を処理したイネ苗の根では、処理後 4 ~ 24 時間に *OsPR10a/PBZ1* と JA 誘導性の *OsPR10b* や *OsPR6* の発現が顕著に誘導されることが明らかとなった (図 3)。また、網羅的な遺伝子発現変動解析により、JA 生合成の鍵酵素をコードする *LOX* や *AOS* の発現も CWP 処理により誘導されることが明らかになった。*OsPR10b* は、先行研究で JA 誘導性であることが報告されている。*OsPR6* はトマトの JA 誘導性 *PR6/CEVI57* のオルソログであり、本実験により JA 誘導性であることが確認された。また、CWP 処理で発現量が増加した *OsPR1#073* も JA 誘導性であることが報告されている。一方、*OsPR10a/PBZ1* の発現はプロベナゾール処理により SA シグナル伝達系を介して誘導されることが一般的に知られている。ただし、JA でも誘導される。PO や CWP を処理したイネ苗の根で *OsPR10a/PBZ1* が誘導されたのは、SA よりも JA の応答によるものと考えられる。さらに、ペルオキシダーゼ遺伝子の発現が JA を処理したイネで誘導される報告もあることから、*OsPrx* ファミリーの 3 遺伝子 (*OsPrx15*、*OsPrx70*、*OsPrx83*) も JA 誘導性の可能性が考えられる。以上から、PO を処理したイネでは JA のシグナル伝達系を介した防御反応が活性化されるものと推察された。

PO は、トマト根では JA のシグナル伝達系を介した防御関連遺伝子の発現を誘導することを既に明らかにしている。既報のトマト根と本研究でのイネ苗の根における、それぞれ PO に対する遺伝子発現変動の応答を比較すると、トマト *PR6/CEVI57* とそのオルソロ

グの *OsPR6* や、JA の生合成に関与する *LOX* と *AOS* の発現上昇がトマトとイネで共通していた。また、JA 非感受性変異体トマトの *jail-1* を用いた解析から、PO を施用したトマトの青枯病に対する発病抑制は JA のシグナル伝達系を介した防御関連遺伝子発現の活性化に依存することが明らかにされている。一方、イネでは変異体による解析は行っていないが、複数の JA 応答性防御関連遺伝子の発現誘導が認められたことから、イネでも JA のシグナル伝達系を介した防御関連遺伝子発現の活性化に伴う発病抑制が生じているものと考えられた。以上から、トマトとイネでは、PO 処理に対して共通して JA シグナル伝達系が活性化され、病害抵抗性が誘導されるものと推察された。

本研究における網羅的な遺伝子発現解析から、防御との関連性が考えられるジャーミン様タンパク質 (GLP) 遺伝子ファミリーに、CWP 処理で増加する遺伝子があることが明らかにされた。特に、CWP 処理により最も発現量が増加した *OsGLP8-7* は、イネいもち病と *R. solani* による苗立枯病の抵抗性発現に関与することが最近報告されている。この知見は、PO 処理が糸状菌病に対しても発病抑制効果を示すことを示唆しているかもしれない。一方、*OsPrx71* や *Osthi1* などのように CWP 処理で発現量が低下した防御関連遺伝子もあることが判明した。特に *Osthi1* の発現は、イネの葉鞘部では、JA によってむしろ誘導されることが報告されている。これらの CWP 処理により減少した防御関連遺伝子についても、PO による防御機構との関連性について解析していく必要があると考えられた。

PO に含まれる CWP は、POD-1 と POD-2 と命名されたそれぞれ 18 kDa と 16.7 kDa のエリシチン様タンパク質で構成されており、最近の研究で、トマトに対するエリシチン活性は POD-1 と POD-2 のジスルフィド結合による 6 量体を構成した構造が重要であることが明らかになっている。今後、PO による抵抗性誘導のメカニズム解明には、この POD-1 と POD-2 のヘテロ 6 量体を認識するレセプターの単離と、同レセプターを介した JA シグナル伝達系活性化の分子機構を明らかにしていくことが必要であると考えられる。また、本研究により、PO はイネもみ枯細菌病菌による苗腐敗症の抑制効果が示されたことから、種子伝染性の細菌性イネ病害の防除に対する PO 資材の利用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① 長谷 修、竹中重仁、前田征之、堀 武志、對馬誠也、生井恒雄、生物防除微生物 *Pythium oligandrum* 施用イネにおける防御関連遺伝子発現の誘導ともみ枯細菌病菌による苗腐敗症の発病抑制、日本植物病理学会報、査読有、79 巻、2013、1-9

- ② 長谷 修、竹中重仁、高橋 翔、中保一浩、河村 陽子、生井恒雄、生物防除微生物 *Pythium oligandrum* 施用トマトの病害抵抗性誘導における β -シアノアラニンの役割、日本植物病理学会報、査読有、78 巻、2012、309-312

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 長谷 修、志賀紗智、竹中重仁、生井恒雄、生物防除微生物 *Pythium oligandrum* 菌体細胞壁エリシチンによるイネ催芽種子の防御応答 [2012, 9, 13-14. 日本植物病理学会東北部会 鶴岡市] 日本植物病理学会報 79 巻、2013、25(講要)
- ② S. Hase, S. Takenaka, M. Maeda, T. Hori, S. Tsushima and T. Namai, Biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces resistance against a bacterial pathogen in rice seedlings, 10th International Congress of Plant Pathology, Aug, 25-30, 2013, , Acta Phytopathologica sinica 43, 2013, p258, Supplement, Beijing, China,

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 修 (HASE, Shu)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：17744536