

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660040

研究課題名(和文) バイオマイクロシリンジとしてのいもち病菌の利用

研究課題名(英文) Use of *Pyricularia oryzae*, the rice blast fungus, as a bio microsyringe to inject protein biopesticide into plant tissue

研究代表者

有江 力 (ARIE, Tsutomu)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00211706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌分生子がトマト葉上に付着、発芽、付着器を形成する条件を見出した。高深度LED-UV照射で99.9%以上致死となる条件を確立、いもち病菌の変異誘導を行ったが、非あるいは弱病原性変異株は取得できなかった。トマト萎凋病菌の分泌型非病原力遺伝子SIX4の常時発現形質転換ベクターを作成、これを用いて、いもち病菌を形質転換、SIX4導入株を取得した。SIX4導入イネいもち病菌の前処理によってトマト萎凋病の発病が有意に抑制されることを見出した。これは、いもち病菌が「バイオマイクロシリンジ」として使用できる可能性を示したものである。

研究成果の概要(英文)：We found the appropriate conditions for germination, adhesion, and appressorium formation of *Pyricularia oryzae*, the rice blast fungus, on tomato leaves. We also establish the conditions of high-depth LED-UV irradiation to be >99.9% lethal, and *P. oryzae* was subjected to induce mutation by LED-UV irradiation under the conditions. Non-or weakly pathogenic mutant strain has not be obtained yet. We constructed a transformation vector for continuous expression of a secreted avirulence gene, SIX4, of tomato wilt fungus. The blast fungus was transformed using this vector, and we successfully obtained the SIX4-introduced transformants. Pretreatment of tomato with the SIX4-introduce transformant significantly inhibited the wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum*. This shows the possibility of blast fungus can be used as "bio microsyringe."

研究分野：植物病理学

キーワード：いもち病菌 感染系 植物病害防除 トマト 萎凋病 タンパク質薬剤 非病原力遺伝子 抵抗性誘導

1. 研究開始当初の背景

植物病害の制御を目的とした対処法で最も一般的なのは病害制御効果を持つ物質、いわゆる農薬等の薬剤の使用である。薬剤は通常、葉面散布や土壌処理等の方法で処理されるが、近年は環境への負荷やドリフトによる他植物への残留などが懸念されている。そのため、薬剤を局所処理する技術の確立が期待されている。さらに、タンパク質薬剤のように極く低薬量で効果を示す薬剤の開発にも興味を持たれている。申請者は、微量で病害制御効果を持つ薬剤を組織へ注入（いわゆる注射）することを発想したが、入手可能な小型シリンジや浸透圧ポンプ等ではそれは達成できなかった。また、そのような技術は国内外を見ても、研究目的で昆虫の口針を利用した注入方法が提示されている程度で、病害防除用の薬剤注入に繋がるような研究は見当たらない。しかしながら、いもち病菌がイネへの感染の過程で形成する単細胞からなる付着器が内部に生じる 8.0 Mpa (約 80 気圧) にも達する膨圧を利用してイネ葉表皮を物理的に貫通して感染糸を挿入し、感染を成立させる (Howard, 1991) ことに基づき、このメカニズムを植物への薬液注入のための「バイオマイクロシリンジ」として利用することを着想した。いもち病菌は菌類であり、外来タンパク質を発現するように形質転換する技術を申請者がすでに保持しているため、この着想が成功すれば、上記の 2 つの目標が同時に達成できることになる。申請者は、イネいもち病菌をこれまで研究材料としてきた (例、Kanamori 2005) ばかりでなく、トマト萎凋病菌が産生する微量な非病原力タンパク質の研究 (例、Inami 2012) を行ってきており、この双方に関わる知見を活用して以下の研究を計画した。研究期間中に申請者は、イネいもち病菌とトマトをモデルとし、

(1) いもち病菌がトマト茎葉部表面で付着器を形成し、感染糸を侵入させる条件を確立する、

(2) 感染能を持つものの非あるいは弱病原性のいもち病菌菌株の選抜・確立、

(3) いもち病菌を形質転換して分泌型非病原力遺伝子 *Six4* タンパク質産生株の作出技術を確立する、

(4) *SIX4* 導入イネいもち病菌を感染条件でトマトに処理し、その後接種する萎凋病菌に対する発病抑制能があることを明らかにする、ことを計画した。

本研究は、いもち病菌が持つ植物への病原性関連能を、植物への薬液注入という新たな技術「バイオマイクロシリンジ」に転換し、病害防除などの植物保護に寄与しようとするところが特徴である。成功すれば、冒頭に記した薬剤に依る病害防除の欠点のない画期的な技術となる。

2. 研究の目的

植物病害の制御のために病害制御効果をもつ物質 (薬剤) を植物組織へ注入することは想定される 1 つの処理方法である。この方法はドリフトなど薬剤散布の問題点を回避できるばかりでなく、注入場所を限定できる、ごく微量で機能するタンパク質薬剤等の実用化が可能になるなど、画期的な変化を及ぼす。しかしながら、現状では樹木幹部への薬剤注入が実用化されている以外では、研究目的で昆虫の口針を利用した注入方法が提示されている程度で、実際、通常の栽培植物組織への薬液注入は大変困難な技術である。本研究では物理的圧力でイネ組織に感染糸を挿入するいもち病菌を利用して、いもち病菌 (の非あるいは弱病原性株) にタンパク質薬剤を生産させることで目的組織に薬液を注入させる新たな技術「バイオマイクロシリンジ」の創成を目指す。

3. 研究の方法

(1) イネいもち病菌がトマト組織表面で付着器を形成し、感染糸を侵入させる条件の確立：イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) Hoku-1 株あるいは P-2 株を用い、分生子懸濁液をトマト葉や茎の表面に置いて感染挙動をとるか、すなわち、①分生子がトマト組織表面に付着するか、②分生子が発芽するか、③付着器を形成するか、④感染糸をトマト組織に侵入させるか、の各項目を観察評価した。イネいもち病菌は、イネ葉表面の物理的・化学的性状を認識して発芽～侵入するとされており、トマト葉面で発芽～侵入しにくい場合は、界面活性剤、イネ葉ワックス層構成成分 (一部市販、その他は抽出)、酵母エキス (酵母エキスに付着器形成調節効果が報告されている)、その他殺菌剤やその原体を含む化合物を処理することで、いもち病菌の②～④の感染挙動をトマト組織で完遂させる条件の探索を行った。

(2) 感染能を持つものの非あるいは弱病原性のいもち病菌菌株の選抜・確立：農工大が持つ先進技術である高深度 LED-UV (261 nm、工学研究院、額額明伯研) のイネいもち病菌の突然変異誘導への利用を試みた。イネいもち病菌 P-2 株分生子懸濁液に、多様な距離・時間、高深度 LED-UV を照射、イネへの感染能を維持しつつも非あるいは弱病原性の株をイネへの生物検定で選抜する。

(3) 形質転換による分泌型非病原力遺伝子 *SIX4* タンパク質 (*Six4*) 産生いもち病菌の作出：トマト萎凋病菌が持つ病原性関連小型染色体には非病原力遺伝子が座乗する。この一つが *AVR1* である。*AVR1* に対応する抵抗性遺伝子 *I* を保持するトマト品種は、*AVR1* 遺伝子産物 (*Avr1*) を認識すると萎凋病菌に対する抵抗性を発動する。そこで、トマトに対する非病原菌であるイネいもち病菌に *Avr1* を発現させ、*I* を保持するトマト品種に予め接種することで萎凋病菌に対する抵抗性を誘導、

AVR1 を持たない萎凋病菌レース 2 や 3 による萎凋病の発病を抑制するという、新生物防除技術につなげることを目論んだ。本研究では、AVR1 である SIX4 を保持するトマト萎凋病菌レース 1 菌株から、SIX4 領域を取得、菌類用形質転換ベクターに組み込む。イネいもち病菌のプロトプラストを誘導、PEG 法によって、上記形質転換ベクターで処理、ベクターに載せてあるハイグロマイシン耐性を指標に分泌型 Six4 を産生する形質転換株を選抜する。同様に、トマト組織に定着性を持つ非病原性 *F. oxysporum* Fo-304 株を同ベクターを用いて形質転換、分泌型 Six4 を産生する形質転換株を作成する。

(4) 分泌型非病原力遺伝子 Six4 タンパク質発現形質転換体を用いたトマト萎凋病発病抑制効果試験：(3) で作出した SIX4 導入用ベクターを導入・選抜した非病原性 *F. oxysporum* Fo304 株とイネいもち病菌において、Six4 が分泌されていることを調査する。これらの菌株を事前に抵抗性遺伝子 *I* を保持するトマト品種苗の根元に処理、レース 2 および 3 に対する発病抑制効果を検定する。

4. 研究成果

(1) イネいもち病菌がトマト組織表面で付着器を形成し、感染糸を侵入させる条件の確立：いもち病菌 P-2 株の分生子懸濁液をトマト葉面に接種して感染挙動と条件を調査した。その結果、平成 26 年度は分生子が付着することを確認した。付着した分生子の発芽、付着器形成は確認できなかったが、平成 27 年度には、GFP 等蛍光タンパク質発現形質転換体も活用し、分生子が発芽し、トマト葉表面で、接種 24~72 時間で高頻度に付着器を形成する条件を見出した (図 1)。しかし、感染糸がトマト葉組織・細胞に侵入させているか観察できていない。GFP 等蛍光タンパク質発現形質転換体を用いても同様であった。ただし、これは、光学顕微鏡に依る観察の限界を示しており、(4) に示すように、SIX4 導入形質転換体で萎凋病の生物防除効果が見られることから、イネいもち病菌がトマト組織に感染糸を侵入させている可能性が高い。

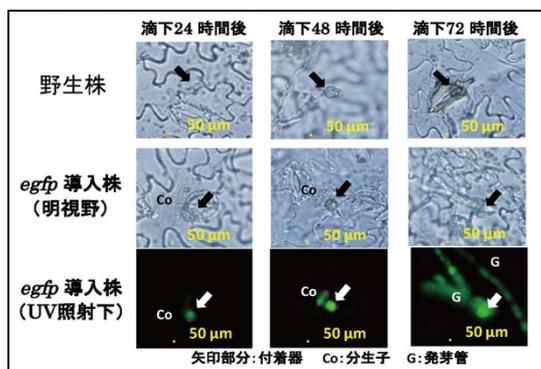


図 1 いもち病菌分生子がトマト葉上で発芽、付着器を形成する条件を見出した。→は付着器を示す。野生株：P-2、egfp 導入株：P-2 GFP 発現株。

(2) 感染能を持つものの非あるいは弱病原性のいもち病菌菌株の選抜・確立：分生子懸濁液 (1×10^5 / ml) に、99.9%以上致死となる高深度 LED-UV の照射条件 (5 分間以上) を設定した (図 2)。設定した条件で高深度 LED-UV を照射、照射後の分生子をイネ葉面に接種、病斑の出ない部分からいもち病菌を分離し、非あるいは弱病原性の変異株の取得を試みたが、現在まで取得できていない。

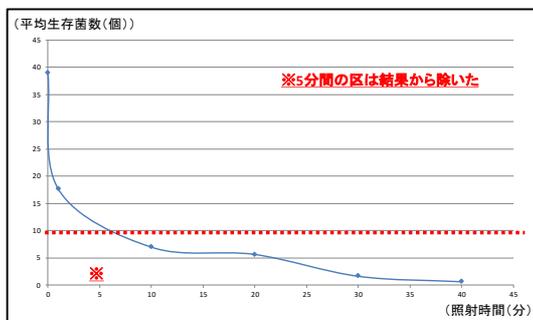


図 2 99.9%以上致死となる高深度 LED-UV の照射条件を設定した

(3) トマト萎凋病菌非病原力遺伝子 SIX4 を導入したイネいもち病菌形質転換体の作出：AVR1 である SIX4 を保持するトマト萎凋病菌レース 1 菌株から、SIX4 領域を切り出し、菌類での常時発現プロモーター pTEF でドライブするベクター pS4MY を作出した (図 3)。これを用いて、イネいもち病菌 Hoku-1 を形質転換、SIX4 導入形質転換体を取得した (図 4)。同様に、トマト組織に定着性を持つ非病原性 *F. oxysporum* Fo-304 株を同ベクターを用いて形質転換、分泌型 Six4 を産生する形質転換株を作成した。

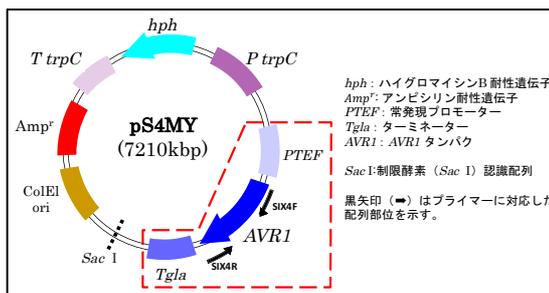


図 3 分泌型 Six4 常時発現形質転換用ベクター pS4MY AVR1 (=SIX4) が菌類用常時発現プロモーター pTEF でドライブされる

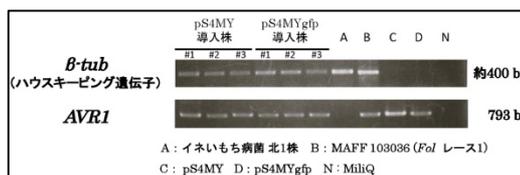


図 4 イネいもち病菌 Hoku-1 株への pS4MY の導入による形質転換 SIX4 を導入した形質転換体を取得した。

(4) トマト萎凋病菌分泌型非病原力遺伝子 *SIX4* を導入した形質転換体によるトマト萎凋病の発病抑制効果: *SIX4* 導入非病原性 *F. oxysporum* を、*I* を保持するトマト品種 (桃太郎) の根部への前処理によって、その後接種したレース 2 および 3 による萎凋病の発病抑制効果を認めた。

さらに、(3) で取得した分泌型非病原力遺伝子 *SIX4* 発現いもち病菌形質転換体をトマト根部や茎葉部に前処理後、トマト萎凋病菌を灌注接種したところ、目論見通り、萎凋病の発病が有意に抑制された (図 5)。これは、「バイオマイクロシリッジ」による非病原力タンパク質の病害防除への利用のチャレンジに成功したことを意味する。

発病抑制効果が期待ほど高くなかったため、*SIX4* 発現量を増強するなど、今後さらなる検討を要する。

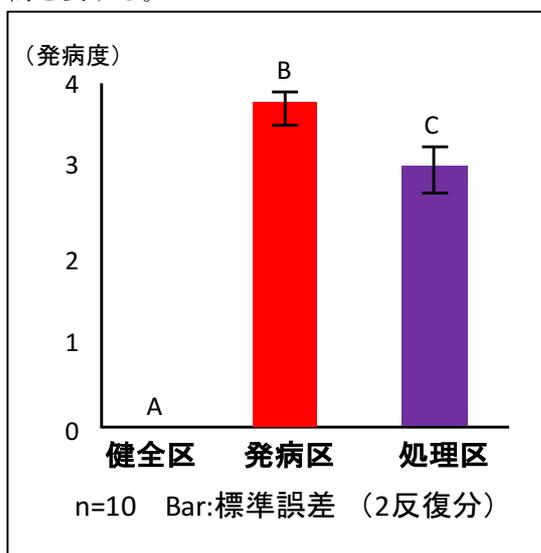


図 5 *SIX4* 発現いもち病菌形質転換体の前処理によるトマト萎凋病の発病抑制

播種 18 日目のトマト (桃太郎、*I i2 i3*) に、*SIX4* 発現いもち病菌形質転換体分生子懸濁液 (1×10^5 分生子/ml; 処理区) あるいは、滅菌水 (発病区) を 800 μ l ずつ葉に噴霧および根部に灌注処理 (前処理)、3 日後に、トマト萎凋病菌レース 2 孢子懸濁液 (1×10^7 孢子/ml) 1 ml を地際部に灌注接種 (健全区は滅菌水)、28 日後に発病検定を行った。2 反復の試験の結果、student の t 検定 ($p < 0.05$) によって、アルファベットが同じものは有意差がないことを示す。発病区 (*SIX4* 発現いもち病菌形質転換体の前処理なし) と処理区 (*SIX4* 発現いもち病菌形質転換体の前処理あり) の間に有意差が存在した。すなわち、*SIX4* 発現いもち病菌形質転換体の前処理したところ、目論見通り、萎凋病の発病が有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kashiwa T, Suzuki T, Sato A, Akai K, Teraoka T, Komatsu K, Arie T (2016) A new biotype of *Fusarium oxysporum* f.

sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene *AVR1*. FEMS Microbiol Lett DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnw132> (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Arie T (2015) Emergence and divergence of the tomato wilt pathogen in the coevolution with tomato, from phylogenetic, molecular and genomic aspects. International Workshop FCA-UNESP and TUAT: 30 years of a successful partnership (11 月 23 日、ボツカツ、ブラジル、招待講演)
- ② 有江 力 (2015) 植物が持つ病害防御能とその誘導・利用. JATAFF セミナー (10 月 29 日、港区、招待講演)
- ③ 赤井浩太郎・柏 毅・新宅ユリエ・寺岡徹・小松 健・有江 力 (2015) 上流にトランスポゾン *Fot5* 様領域の挿入を有する *AVR1* を持つトマト萎凋病菌レース 2. 日本植物病理学会創立 100 周年記念大会・平成 27 年度大会 (3 月 30 日、千代田区)

[図書] (計 1 件)

- ① 有江 力 他 (2015) 植物菌類学、「日本植物病理学 100 年史」、日本植物病理学会、日植病報 81 (EI) :50-67 (分担執筆)

[その他]

ホームページ等

<http://web.tuat.ac.jp/~plantp/labjtop.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有江 力 (ARIE, Tsutomu)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 00211706

(2) 研究協力者

柏 毅 (KASHIWA, Takeshi)
東京農工大学・大学院連合農学研究科・博士課程学生

山田 麻貴 (YAMADA, Maki)
東京農工大学・大学院農学府・修士課程学生

赤井 浩太郎 (AKAI, Kotaro)
東京農工大学・大学院農学府・修士課程学生

毛利 千里 (MOURI, Chisato)
東京農工大学・大学院農学府・修士課程学生

長谷川 凌 (HASEGAWA, Ryo)

東京農工大学・大学院農学府・修士課程学生

瀨織 明伯 (KOKITSU, Akinori)
東京農工大学・理事副学長

熊谷 義直 (KUMAGAI, Yoshinao)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授

山本 玲緒 (Yamamoto, Reo)
(株)トクヤマ 開発センター(つくば)・研究院