

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660095

研究課題名(和文)植物/原生生物間化学交信～根こぶ病菌宿主認識因子の同定～

研究課題名(英文)Chemical communication between plants and protists: Identification of a factor of Plasmodiophora brassicae to recognize its hosts

研究代表者

松井 健二(Matsui, Kenji)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：90199729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：根こぶ病原体がなぜアブラナ科植物に特異性を示すのか、を明らかにし、この宿主特異性をターゲットにした根こぶ病防除方法の開発に資するために根こぶ病菌休眠孢子発芽誘因物質の単離精製を目指した。その中でパーコール密度勾配遠心による発芽誘因活性評価に適した休眠孢子の効率的な調製方法を確立し、そうして得た休眠孢子を用いたアッセイで発芽誘因物質はアブラナ科植物だけでなく、マメ科(ダイズ)、イネ科(エンバク)の根にも存在し、アブラナ科植物だけが土壤中に分泌していることが明らかとなった。またハクサイ由来の発芽誘因物質は高分子と低分子の少なくとも2成分からなり有機溶媒に不安定な物質であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the host specificity of Plasmodiophora brassicae that cause clubroot disease in Brassicae plants, we attempted to identify substances that induced germination of the resting spores of P. brassicae to release zoospores. At first, we purified the resting spores with density gradient centrifugation with Percol, which made us to estimate the germination rate efficiently. Based on the results obtained with the bio-assay, we realized that the substances that induced germination of the resting spores occurred in roots of soybean and oat as well as Chinese cabbage, and that only Chinese cabbage secreted the substances into oil from roots. The substances obtained from Chinese cabbage roots consisted of at least two components with low and high molecular weight. Both of them seemed to be quite unstable in the presence of organic solvent.

研究分野：植物代謝生化学

キーワード：根こぶ病菌 休眠孢子 発芽 ハクサイ ダイズ 根滲出液

## 1. 研究開始当初の背景

アブラナ科植物根こぶ病は病原体 *Plasmodiophora brassicae* Woronin によってアブラナ科植物特異的に発生する土壤伝染性病害である。根こぶ病に罹病すると根に多数のこぶを生じ、養分と水の吸収が阻害され、地上部の生育が抑制され、萎凋し、最終的には枯死することもある。本病原体は 1867 年に Woronin により記載され、150 年もの間研究されてきたが、有効性の高い防除方法は開発されておらず、今なお世界各国で深刻な被害をもたらしており、アブラナ科作物の収量の 10-20% の損失をもたらしていると見積もられている。これまでに根こぶ病抵抗性品種として CR (Clubroot-Resistant) 系統が育成され、一定の効果を示してきたが、2013 年頃から個の抵抗性を打破した病原体が出現し、制御できない難治病となっている。こうした状況は、根こぶ病原体のアブラナ科植物感染機構の詳細が解明されていないためであり、根こぶ病原体のアブラナ科植物特異性が分子レベルで明らかになればその機構に基づいた防除技術の開発が可能となるはずである。本研究はこうした背景に基づいて策定され、アブラナ科植物と根こぶ病原体の化学物質を介した相互作用を解明することでこの相互作用をターゲットにした薬剤開発に資する知見を提供することを目指した。

## 2. 研究の目的

根こぶ病はアブラナ科植物特異的な土壤伝染性病害である。我が国ではキャベツやハクサイの重要病害として知られ、海外でも各種アブラナ科野菜のほか搾油用ナタネで壊滅的な被害をもたらして大きな問題となっている。しかし、本病の十分に効果的な防除法は確立されていない。これは根こぶ病菌の休眠孢子が土壤中で 7~8 年にもわたり感染能を保持したまま生存するため、本菌がいったん圃場に定着するとその根絶は極めて困難なためである。

根こぶ病はケルコゾア門に属する原生生物 *Plasmodiophora brassicae* の寄生によって引き起こされる。本菌休眠孢子は土壤中で宿主の根の伸長を感知すると発芽し、第一次遊走子を放出する。第一次遊走子はアブラナ科植物の根に誘引され、根毛細胞内に侵入し、感染が始まる<sup>(1,2)</sup>。

根こぶ病菌は絶対寄生菌であり宿主の細胞内でなければ増殖できない。そのため、*P. brassicae* 休眠孢子はアブラナ科植物の根から放出される特異的な化合物を認識して初めて発芽する。また、遊走子は宿主となる植物根からの化学因子を捕捉し運動方向を定める<sup>(1,2)</sup>。

この感染機構には基礎的、および実用的チャレンジがある。基礎的課題は、こうした特異的な植物-原生生物間化学相互作用がなぜ、どのように確立したのか、である。これを紐解くにはこの化学交信の実体を解明しなく

てはならない。実用的課題はこうした化学因子を用いることによる根こぶ病の効果的な防除技術の開発である。本研究ではこれら挑戦的課題にアプローチするために根こぶ病菌休眠孢子発芽誘導因子、遊走子誘引因子を単離同定することを目的とする。これら因子の構造を解明し、宿主がなぜこれら因子を生成、放散するのか、寄生者はどのように宿主植物を他の植物から区別しているのか、を明らかにすることを通して、この特異な植物-原生生物相互作用成立過程解明の基盤を確立する。一方、これらのアブラナ科植物由来因子を耕作前に圃場に散布して土壤中の休眠孢子的発芽を人為的に誘導し、宿主を探せないままに死滅させ、また、遊走子の宿主探索をかく乱し、感染効率を低下させることにより、効果的な根こぶ病防除技術を提供する。

[引用文献](1)田中 (1996) アブラナ科植物根こぶ病研究の最近の進歩. *植物防疫* **50**: 281-284. (2) \*Tanaka S, Ito S (2013) Pathogenic and genetic diversity of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot) from Japan. *J General Plant Pathol.* **79**: 297-306.

## 3. 研究の方法

ハクサイ (品種: 野崎二号) と山口県萩市の圃場から単離した *P. brassicae* (以降菫菌) の組合わせで効率よく休眠孢子を調製できる。根こぶ病原体休眠孢子を  $1.0 \times 10^6$  spore  $g^{-1}$  で培養土に散布し、そこにハクサイ (野崎二号) を播種し、2-3 ヶ月後、十分に根こぶが成長した段階で根こぶを回収した。得られた根こぶは脱イオン水とともに破碎し、遠心操作を繰返して休眠孢子粗画分を得た。休眠孢子数はトーマ氏血球計算板で計数した。休眠孢子的生死判定はエバンスブルー染色で実施した。

これまで、休眠孢子的発芽は発芽後に遊走子が放出されて残った休眠孢子的殻 (ゴースト) を計数することで評価されてきた。エバンスブルー染色で検鏡するとある程度の精度で計数可能であったが、死細胞とゴーストの見分けが困難で大きな誤差を伴っていた。そこで、本研究では発芽して放出した遊走子を確実に計数する実験系の確立に多くの時間を割いた。そのために、冷凍保存したハクサイ根こぶを室温で 2 週間腐敗させてから休眠孢子を回収する方法と実験室内で罹患させ十分に成長させた新鮮な根こぶからの回収を実施し、その遊走子放出頻度を比較した。また、得られた休眠孢子を精製する目的でフィコール、およびパーコール密度勾配遠心を試みた。

休眠孢子的発芽試験は、宿主であるハクサイ、おとり植物として知られるエンバク、非宿主のダイズから得た抽出物、および根からの浸出液を用いて実施した。典型的な試験では休眠孢子を  $1.0 \times 10^7$  spore  $mL^{-1}$  となるように抽出液・浸出液に添加し、22 °C で 2-10

日間培養し、その間毎日検鏡することで実施した。透析膜を用いた試験では5 mL容のプラスチックチューブの下半分を切り落として逆さに置き、キャップ部分に透析膜を挟み込み、キャップ側の空間に休眠孢子懸濁液を、チューブ側に植物培養液を満たし、その中にハクサイ芽生えを入れて実施した。この時用いた透析膜の分画分子量は14,000である。またハクサイ根滲出液は等量の酢酸エチルで抽出し、得られた酢酸エチル抽出物を乾固後、残留物を水に懸濁して発芽試験に用いた。

#### 4. 研究成果

これまで十分な発芽能力を持つ休眠孢子を得るには根こぶを腐敗させる必要があるとされてきたが、腐敗した根こぶから回収した休眠孢子懸濁液には様々な微生物が存在し、これら微生物の影響を排除できないこと、また、検鏡の際に休眠孢子、遊走子を確実に計数できないことから発芽能力評価に支障を来してきた。そこで、腐敗させない根こぶから回収した休眠孢子的感染能を調べた。その結果、実験室内で成長させた新鮮なハクサイ根こぶから得た休眠孢子は腐敗処理した根こぶから回収した休眠孢子と同程度にシロイヌナズナ根毛に感染した。一方、長期間-30°Cで保存していた根こぶから回収した休眠孢子は感染能が劣っていた。そのため実験室内で常時新鮮な根こぶを用意し、腐敗処理せずに休眠孢子を調製することとした。

こうした手法で得た休眠孢子でも雑菌や死細胞が多く混在しており、そのままでは発芽試験に適さなかった。そこで、パーコール密度勾配遠心により休眠孢子的精製を試みた。90%から10%まで10%刻みで段階的に濃度を変えたパーコール溶液を試験管内に重層し、その上に休眠孢子懸濁液を重層してスウィング型ローターで1500 rpmで20分遠心した。その結果、40%パーコールと20%パーコールにそれぞれバンドが形成された。そのうち、40%パーコール層に出現したバンドを回収すると比較的サイズが揃い、90%程度の生存率の休眠孢子を得ることに成功した。この画分には雑菌がほとんどなかった。

ついで、種々の植物抽出液による休眠孢子的発芽誘導能力を評価した。ハクサイ、ダイズ、エンバク水耕液(根滲出液を含むと期待される)とそれぞれの根の水抽出物に休眠孢子を加え、10日後に検鏡し、遊走子を数えた。その結果、水耕液ではハクサイ水耕液だけが発芽を誘導しており、ダイズ、エンバク水耕液では遊走子の放出は認められなかった。一方、根の水抽出物に関してはハクサイ、ダイズ、エンバクともに同程度の遊走子放出が認められた。この結果、根こぶ病原体休眠孢子的発芽誘因物質は広く植物根に存在するが、ハクサイだけが根から放出している可能性が示唆された。

ついでハクサイ水耕液を透析膜で高分子と低分子に分け、発芽誘因物質のサイズを見

積もった。この際用いた透析膜の分画分子量は14,000である。根こぶ病原体休眠孢子はこの処理で得られた高分子画分でも低分子画分でも同程度に発芽し、遊走子を放出した。そのため発芽誘因物質は単独ではなく複数の成分からなることが示唆された。

また、ハクサイ水耕液を酢酸エチルで抽出し、発芽誘因物質の極性を評価しようとしたが、水耕液を酢酸エチルと混和すると発芽誘導活性が失われた。そのため、発芽誘因物質は有機溶媒処理により失活すると考えられた。

現在、引き続いてハクサイ水耕液から発芽誘因物質の精製を進めている。今までのところ、低分子画分の活性は比較的安定でイオン交換樹脂により精製可能であるとの知見を得ている。残念ながら本研究課題の最終目的である発芽誘因物質の同定は研究期間で達成できなかったが3年間に及ぶ試行錯誤により基盤となる技法をほぼ確立できたので比較的早い時期に当該物質を同定することが可能であると考えている。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

「アブラナ科野菜および雑草根こぶ病菌のDNA多型と宿主特異性」石田彩佳、陣内暉久、佐々木一紀、田中秀平、伊藤真一  
日本植物病理学会関西西部会、静岡県コンベンションアーツセンター(静岡県・静岡市・駿河区)

平成28年9月29日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

松井健二 (Matsui, Kenji)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：90199729

(2)研究分担者

田中秀平 (Tanaka, Shuhei)

山口大学・その他部局・名誉教授

研究者番号：50116729

肥塚崇男 (Koezuka, Takao)

山口大学・大学院創成科学研究科・助教

研究者番号：30565106

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )