

植物内生放線菌を活用した植物病害の生物防除法の開発

清水 将文 (岐阜大学 応用生物科学部)

shimizma@gifu-u.ac.jp

多種多様な二次代謝産物を生産する放線菌は、医薬品・発酵産業の分野で非常に重要な微生物群である。放線菌の最大の生息場所は土壌であることから、抗生物質等の探索源として土壌放線菌が古くから盛んに研究されてきた。そして 1990 年代に入ると、植物体内に内生する放線菌が新たな抗生物質探索源としてひそかに注目を集めるようになった。筆者は、この植物内生放線菌に植物病害の生物防除エージェントとしての可能性を見出し、有望菌株の探索とそれら菌株を活用した実用的生物防除法の開発に取り組んできた。本稿では、植物生産の現場で既に利用されている植物内生放線菌を用いた耐病性組織培養苗の育成技術について紹介する。

はじめに

同一の遺伝的形質を有する植物個体を大量増殖する技術として、花卉・蔬菜・樹木等の生産現場では組織培養が広く普及している。しかし、組織培養で得られる無菌の植物苗は概して軟弱で、屋外環境への馴化の過程で様々な病気に罹り枯死しやすい(図1)。殺菌剤の予防散布が有効な対処策のひとつではあるが、使用できる登録農薬が少ない上に、組織培養苗には日和見感染菌を含む多種多様な病原菌が感染するため、枯死被害の回避は困難を極める。他方、閉鎖された馴化施設内での農薬散布は作業従事者の健康被害を招く危険性が高いため、散布量の低減が求められている。



図1 馴化中に発生した病害によるシャクナゲ組織培養苗の大量枯死

このような背景から、本研究では、植物内生放線菌を利用した耐病性シャクナゲ組織培養苗の育成技術を開発するとともに、その耐病性化機構を解析した。

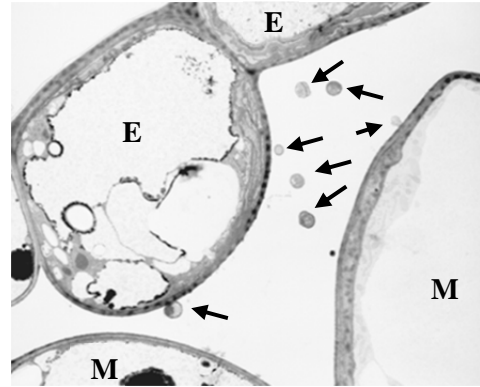
1. 植物内生放線菌の分離と候補菌株の選抜

野外で生育していたシャクナゲの根、茎、葉を表面殺菌し、寒天培地上で培養した。約1ヵ月経つと試料表面に放線菌のコロニーが出現してきたので、それらを釣菌・純化して数十株の内生放線菌を得た。抗菌性内生放線菌を組織培養苗に定着させれば、放線菌が苗内で抗菌物質を生産し、定着苗が耐病性化すると考えられた。そこで内生放線菌を優占的に苗内へ定着させるため、無菌培養中の組織培養苗にあらかじめ放線菌を接種するという新規の手法を考案した。本法に適合する菌株を選抜する目的で、分離した放線菌株の組織培養培地上での生育性を検討するとともに、シャクナゲの主要病原菌であるペスタロチア病菌 (*Pestalotiopsis sydowiana*) および根腐病菌 (*Phytophthora cinnamomi*) に対する抗菌活性を対峙培養検定した。これにより、組織培養培地上

で旺盛に生育し、両病原菌に強い抗菌活性を示す R-5 株（後に MBR-5 株に改名）を候補株として選抜した¹⁾。また、形態、培養性状、生理生化学的性状および 16S rDNA の塩基配列を解析し、MBR-5 株を *Streptomyces galbus* Frommer と同定した⁶⁾。

2. MBR-5 株のシャクナゲ組織培養苗への定着

MBR-5 株の培養菌液を無菌フラスコ内の組織培養培地の表面に接種した後、経日的にシャクナゲ苗をサンプリングし、再分離を行った。その結果、接種後 7~14 日以内には MBR-5 株がシャクナゲ苗全体に移行して定着していることが明らかとなった²⁾。さらに、それらの苗を走査型・透過型電子顕微鏡で観察したところ、MBR-5 株は苗表面で菌糸伸長するとともに、気孔から侵入して葉内部の細胞間隙に定着（図 2）していることが明らかとなった^{4,7)}。なお、MBR-5 株定着苗には何ら病的な症状は現れなかった。



第 2 図 シャクナゲ苗の葉内部に侵入し、細胞間隙で菌糸を伸展する MBR-5 株。E；表皮細胞，M；葉肉細胞，矢印；MBR-5 株菌糸

3. MBR-5 株定着苗の耐病性

MBR-5 株定着苗の葉 1 枚にペスタロチア病菌を接種した結果、接種葉は褐変枯死したものの、2 週間経っても周囲の茎葉にまでは病徴が全く広がらず、顕著な耐病性を示した（図 3）²⁾。さらに、根腐病菌を接種した培養土に MBR-5 株定着苗を移植したところ、MBR-5 株無接種苗に比べて発病が 70%以上抑制され、殺菌剤と同等の発病抑制効果が得られた⁵⁾。そこで、MBR-5 株定着苗をセルトレイに移植し、馴化ハウス内で殺菌剤を散布せずに馴化栽培した。その結果、MBR-5 株無接種の苗は 50%以上が自然発生した病害により枯死したが、MBR-5 株定着苗では枯死率が 7%程度に抑制され（図 4）、実際現場での有効性が実証された⁵⁾。

これらの結果を基に、MBR-5 株を用いた耐病性組織培養苗の育成技術（米国特許 US 6,544,511 B2，特許第 3629212 号）は、国内の園芸企業で数万鉢／年のツツジ科花木の生産（最盛期でシャクナゲ 12 万鉢，カルミア 50 万鉢／年）に現在利用されている。

4. MBR-5 株定着苗の耐病性化機構の解析

当初の発想からすれば、シャクナゲ苗の耐病性化は、MBR-5 株が苗内で生産する抗菌物質が原因であると考



図 3 MBR-5 株定着苗のペスタロチア病耐性。左；MBR-5 株無接種苗，右；MBR-5 株定着苗



図 4 馴化中に自然発生した病害に対する MBR-5 株定着苗の耐病性。左；MBR-5 株無接種苗，右；MBR-5 株定着苗

えられた。そこで、まず MBR-5 株が生産する抗菌物質を同定した。その結果、MBR-5 株は 2 種類の抗生物質、アクチノマイシン X₂ とフンギクロミンを生産することが明らかとなった⁶⁾。これらの抗生物質が苗内で生産されているかを調べるため、MBR-5 株定着苗内の抗生物質の蓄積量を測定した結果、約 20 μg/g 苗のアクチノマイシンが蓄積していることが明らかとなった。このことから、市販の抗生物質（アクチノマイシン D；アクチノマイシン X₂ の類縁体、アンホテリシン B；フンギクロミンの類縁体）をシャクナゲ苗に投与し、耐病性化するか検討したが、いずれの抗生物質処理苗も MBR-5 株定着苗ほどペスタロチア病と根腐病に顕著な耐病性を示さなかった³⁾。この結果を基に、MBR-5 株定着苗の耐病性化には誘導抵抗性が関与すると考え、防御関連遺伝子の発現解析を試みた。シャクナゲはマイナーな園芸植物であるため解析が困難であったので、MBR-5 株の宿主範囲に含まれるシロイヌナズナをモデル植物として実験に供試した。まず、MBR-5 株を定着させたシロイヌナズナの葉に炭疽病 (*Colletotrichum higginsianum*) を接種したところ、顕著な耐病性を示すことが確認された。そこで、MBR-5 株定着シロイヌナズナにおける防御関連遺伝子群の発現をノーザンブロット解析した結果、サリチル酸誘導マーカー遺伝子はほとんど発現していなかったが、ジャスモン酸/エチレン誘導マーカー遺伝子である抗菌性タンパク質遺伝子 (*PDF1.2*) の発現が著しく増強されていた。さらに、MBR-5 株定着シロイヌナズナではファイトアレキシン (カマレキシン) の蓄積量が著しく増加することも突き止めた。これらの結果から、MBR-5 株定着シロイヌナズナではジャスモン酸/エチレン誘導性の全身抵抗性が活性化されることが明らかとなった⁸⁾。そして、その後の解析から、シャクナゲ組織培養苗においても MBR-5 株接種で同様の病害抵抗性が活性化されることが確認された。

おわりに

環境負荷や薬剤耐性病原菌の出現などの問題を背景に、欧州をはじめとする世界各国で化学合成農薬の使用量削減が強力に推進されており、産官学が連携して代替防除技術の開発を急ピッチで進めている。中でも有用微生物による植物病害の生物防除法は中核的技術として注目されており、微生物農薬の市場規模は近年驚くべき勢いで拡大しているが、残念ながら我が国の生物防除研究は未だ諸外国ほど活発化していない。本稿では、受賞の対象となった研究のうちのひとつを紹介した。これ以外にも筆者は、植物内生放線菌を利用したキャベツセル成型苗黒すす病 (特許第 5380648 号)、ウリ科およびイチゴの炭疽病の生物防除法 (特開 2011-188761) などを開発してきた^{9, 10)}。さらに、植物内生放線菌とは別の有用微生物による生物防除法の開発にも現在取り組んでいる。今回の受賞を励みに、これらの研究を今後さらに発展させ、ひとつでも多くの生物防除法を開発・実用化し、持続的かつ安定的な植物生産に貢献していきたいと考えている。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、日本土壤微生物学会から推薦を賜りました。日本土壤微生物学会の齋藤雅典会長、相野公孝副会長をはじめ、関係の先生方に心より感謝申し上げます。また、受賞対象となった一連の研究を行うにあたり、多くの方々にご指導、ご協力をいただきました。特に、久能 均先生 (三重大学名誉教授) には学生時代から格別のご指導ご鞭撻を賜りました。ここに記して深謝の意を表します。最後に、私の研究活動を支えてくれている家族全員に最大の感謝を表します。

引用文献

- 1) **Shimizu, M.**, Nakagawa, Y., Sato, Y., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, R. and Kunoh, H. (2000) Studies on endophytic actinomycetes (1) *Streptomyces* sp. isolated from rhododendron and its antifungal activity. J. Gen. Plant Pathol. 66 : 360-366.
- 2) **Shimizu, M.**, Fujita, N., Nakagawa, Y., Nishimura, T., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, R. and Kunoh, H. (2001) Disease resistance of tissue-cultured seedlings of rhododendron after treatment with *Streptomyces* sp. R-5. J. Gen. Plant Pathol. 67 : 325-332.
- 3) **Shimizu, M.**, Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Nishimura, T., Yoshida, R. and Kunoh, H. (2001) Association of induced disease resistance of rhododendron seedlings with inoculation of *Streptomyces* sp. R-5 and treatment with actinomyin D and amphotericin B to the tissue-culture medium. J. Antibiot. 54: 501-505.
- 4) Minamiyama, H., **Shimizu, M.**, Kunoh, H., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H. and Yoshida, R. (2003) Multiplication of isolate R-5 of *Streptomyces galbus* on rhododendron leaves and its production of cell wall-degrading enzymes. J. Gen. Plant Pathol. 69: 65-70.
- 5) 清水将文 (2003) 内生放線菌を用いた病害耐性組織培養苗の作出. 拮抗微生物による作物病害の生物防除—我が国における研究事例・実用化事例—, クミアイ化学工業, 東京, pp.97-104.
- 6) **Shimizu, M.**, Igarashi, Y., Furumai, T., Onaka, H., Kunoh, H. (2004) Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites. J. Gen. Plant Pathol. 70: 66-68.
- 7) Suzuki, T., **Shimizu, M.**, Meguro, A., Hasegawa, S., Nishimura, T. and Kunoh, H. (2005) Visualization of infection of an endophytic actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured rhododendron. Actinomycetologica 19: 7-12.
- 8) **Shimizu, M.**, Suzuki, T., Mogami, O. and Kunoh, H. (2005) Disease resistance of plants induced by endophytic actinomycetes. In: Genomic and Genetic Analysis of Plant Parasitism and Defense (Tsuyumu, S., Leach, E. J., Shiraiishi T. and Wolpert, T. eds), APS Press, St. Paul, MN. pp.292-293.
- 9) **Shimizu, M.**, Yazawa, S. and Ushijima, Y. (2009) A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose. J. Gen. Plant Pathol. 75: 27-36.
- 10) **Shimizu, M.**, Hyakumachi, M., Kubota, M. and Kuroda, K. (2013) Biocontrol of *Alternaria brassicicola* on cabbage seedlings and *Glomerella cingulata* on strawberry seedlings by endophytic *Streptomyces* spp. IOBC-WPRS Bulletin 86: 213-218.

特許

- 1) Nishimura, T., Kunoh, H., Furumai, T., Igarashi, Y., Sato, Y. and **Shimizu, M.** US 6,544,511 B2. 2003年4月登録.
- 2) 西村富生, 久能均, 古米保, 五十嵐康弘, 佐藤幸雄, 清水将文. 特許第 3629212 号. 2004年12月登録.
- 3) 清水将文. 特許第 5380648 号. 2013年10月登録.
- 4) 清水将文, 大野鉄平. 特開 2011-188761. 2011年9月出願

Biological Control of Plant Diseases using Endophytic Actinomycetes

Masafumi Shimizu (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Shimizma@gifu-u.ac.jp