

■ 研究課題名

環境保全型病害防除技術の核となる広スペクトル微生物農薬の開発

■ 研究項目と実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ① *Pythium oligandrum* (P0) の作物根圏への定着性および病害抑制機能の解明
（◎竹中 重仁／（独）農研機構 北海道農業研究センター）
- ② P0 施用作物における分子応答機構の解明
（高橋 英樹／国立大学法人東北大学）
- ③ バイオセンサーを用いた P0 適応土壌の解明
（加来 久敏／株式会社サカタのタネ）
- ④ P0 の大量培養法、製剤化および保存性の検討
（半澤 卓／北海三共株式会社）
- ⑤ 園芸作物、イネ病害防除技術開発のための P0 の性能最適化
（山中 聡／アリスライフサイエンス株式会社）
- ⑥ 畑作物病害防除技術開発のための P0 の性能最適化
（清水 基滋／北海道立十勝農業試験場）

■ 研究の目的

土壌生息菌 *Pythium oligandrum* (P0) は、①多くの病原菌に寄生する能力、②植物根から供給される栄養や生息域を勝ち取る競争能力、③植物に病害抵抗性を誘導する能力など、微生物農薬として極めて優れた特性を有する。そこで、この P0 の機能を徹底的に究明するとともに、P0 の製剤化を検討し、トマト青枯病を始めとした重要病害に対する P0 の性能最適化を図ることにより、広範囲な作物病害に効果のある「広スペクトル微生物農薬」を開発する。

■ 主要な成果

- ① 根圏での P0 の定着性を解明するため、土壌からの P0 の特異的検出定量法と特異的染色法を開発した。これにより、P0 は土壌の殺菌の有無にかかわらず卵胞子の施用量が増加するとトマトの根圏での定着量が増加すること、P0 はトマトの根部の表皮細胞および根毛に定着し（図 1）、一部は表皮細胞内に侵入する。
- ② P0 はトマト根圏での定着量が少なくてもトマト青枯病に抑制効果を示し（図 2）、P0 が主根の基部等に定着することにより抵抗性が誘導され（図 3）、側根等の傷口から侵入した青枯病の上部への増殖を抑制する（図 4）。
- ③ P0 の抵抗性誘導物質として、POD-1 と POD-2 という 2 種類のタンパク質からなる P0 の細胞壁タンパク質画分（CWP）（図 5）が関与している。P0 の CWP をトマトの根に処理すると、表 1 に示すように、植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) やエチレン (ET) を介したシグナル伝達系に関与する遺伝子、糖代謝やアミノ酸代謝に関わる遺伝子、ファイトアレキシン合成などの 2 次代謝系に関わる遺伝子の発現が強く誘導される。また、P0 の卵胞子を施用しても CWP 処理と共通した遺伝子の発現が確認され、P0 の卵胞子と CWP 処理で、共通したシグナル伝達系が活性化される。
- ④ P0 によるトマト青枯病の抑制機構は抵抗性誘導が主因で、その分子機構を一部仮説も含めて図 6 にまとめた。すなわち、P0 がトマト根部に近づくと、P0 の菌体細胞壁に存在する POD-1 と POD-2 が有するセルロース結合能力によりトマトの細胞壁に付着する。トマトは POD-1 と POD-2 の形成する複合体のある構造部分を認識して、SGT1 や RAR1 タンパク質を介して JA と ET のシグナル伝達系を活性化させる。その際、ユビキチンリガーゼ *LeATL6*

は、標的タンパク質 SAMDC にユビキチンを付加させプロテアソームで分解させることにより ET 合成を亢進するとともに、JA シグナル伝達系を介して下流にある防御関連遺伝子 *PR-6* の発現を制御する。また、ET 合成の過程で発生するシアンの解毒のため、CAS 遺伝子が一過的に発現上昇して無毒のシアノアラニンを生成し、これが JA シグナル伝達系を活性化させ *PR-6* の発現を誘導する。このように P0 により亢進される JA と ET のシグナル伝達系はネットワークを形成し、相互に協調的に防御関連遺伝子群の発現を誘導する。

- ⑤ P0 製剤の主成分として卵胞子を選定し、市販の「人参濃縮ジュース」3%の液体培地で静置あるいは通気攪拌培養することにより、大量の卵胞子が低コストで得られる。次に、P0 製剤として水和剤と顆粒水和剤の処方を検討し、水中での分散が良好な顆粒水和剤（卵胞子濃度 10^6 個/g）の製造に成功した（図7）。また、本製剤は脱酸素剤を入れた場合は室温で6ヶ月間以上の保存が可能であった。
- ⑥ 有効な登録農薬がないトマト青枯病に対して、本 P0 製剤は(a)鉢上げ時1回処理と(b)鉢上げ+定植1週間前の2回処理では防除価が低いが、(c)鉢上げ+定植1週間前+定植2週間後の3回処理することにより、有意に発病を抑制する（図8）。
- ⑦ 本 P0 製剤は、種いもを P0 卵胞子濃度で 1×10^4 個/ml に瞬間浸漬して風乾する処理法で、種いも伝染するジャガイモ黒あざ病に対して有効である（図9）。また、本処理により土壌伝染するジャガイモ黒あざ病に対しても効果が認められ、その防除効果は化学農薬より高い。
- ⑧ 本 P0 製剤はイネばか苗病、イネ苗立枯細菌病、イネもみ枯細菌病、イネごま葉枯病、イネ褐条病に対して、現在、上市されている化学農薬並みあるいはそれらより優れた防除効果を示した。

■ 公表した主な特許と論文

- ① Takenaka, S., *et al.*. Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biocontrol of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser scanning microscopy. *Phytopathology* 98:187-195 (2008).
- ② Takenaka, S., *et al.*. Novel elicitin-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Molecular Plant Pathology* 7: 325-339 (2006).
- ③ Hase, S., *et al.* Jasmonic acid signaling is required for bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology* 57:870-876 (2008).
- ④ Hondo, D., *et al.* Up-regulation of *LeATL6* that encodes a fungal elicitor-responsive ubiquitin ligase induces jasmonic acid-dependent *proteinase inhibitor* gene expression in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 72-81 (2007)

■ 今後の展開方向

- ① 卓効を示す化学合成農薬のないトマト青枯病に対する微生物農薬として、農薬登録に向けた準備を進める。
- ② P0 の CWP による抵抗性誘導機構解明を継続し、将来的なプラントアクティベーター開発のための基盤情報を得る。

■ 問い合わせ先

- ① 北海三共株式会社・農業科学研究所（011-370-2103）
- ② 北海道農業研究センター（011-857-9260、seika-narch@naro.affrc.go.jp）

■ 研究成果の具体的図表

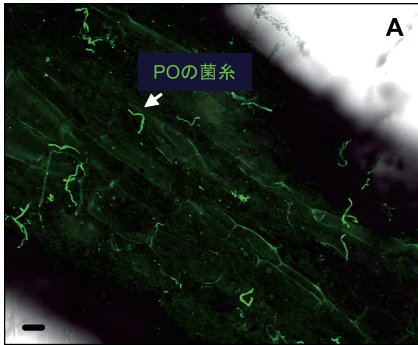


図1 トマト根部表面上に定着しているP0の菌糸
スケールバーは50 μmを示す。

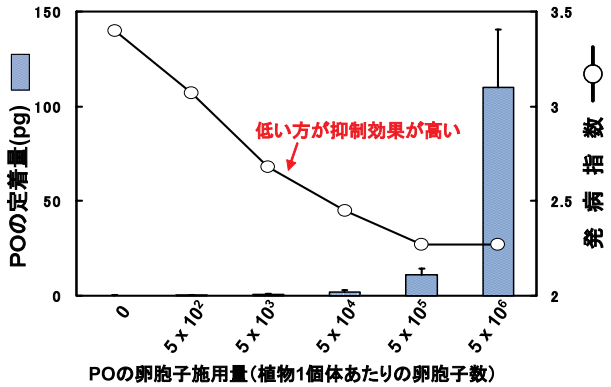


図2 P0のトマト根圏での定着量とトマト青枯病抑制効果

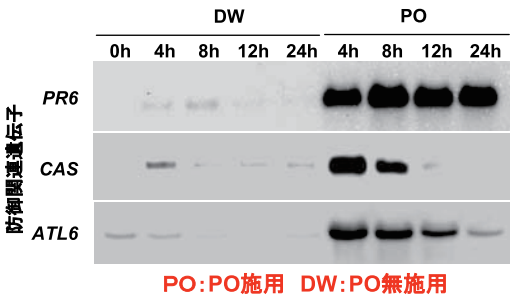


図3 P0定着によりトマトで誘導される
防御関連遺伝子

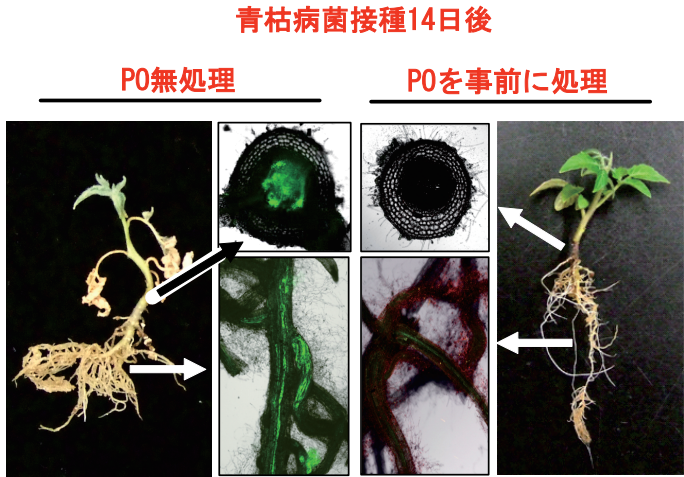


図4 P0処理および無処理トマトの茎部と根部における
青枯病菌の動態観察 P0は赤色蛍光に、
青枯病菌は緑色蛍光に染色されている。

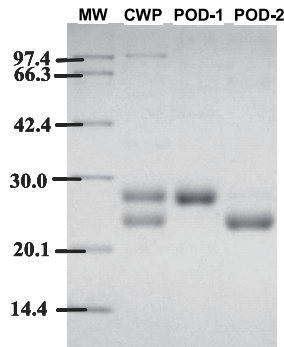


図5 POD-1とPOD-2からなる
P0の細胞壁タンパク質
(CWP)

表1 PO菌およびPOのCWPを処理したトマトの根部で発現が亢進された遺伝子

遺伝子の特性	BLASTNとBLASTXによる推定遺伝子	PO菌による発現強度 ^a	CWPIによる発現強度 ^a
二次代謝関連	chorismate synthase 1	6.26	6.25
"	3-dehydroquinate dehydratase (EC 4.2.1.10)	4.81	8.10
"	farnesyl pyrophosphate synthase	10.60	9.74
"	L-asparaginase	3.06	5.29
一次代謝関連	transaldolase	4.20	5.07
"	ATP-citrate lyase	9.29	5.03
ETシグナル関連	ethylene receptor homolog	4.16	9.08
"	beta-cyanoalanine synthase (CAS)	7.40	13.50
JAシグナル関連	lipoxygenase (LOX)	4.46	5.27
転写因子	bZip DNA-binding protein	13.20	13.80
ユビキチンプロテアソーム関	RING-H2 zinc finger protein ATL6 (LeATL6)	5.41	13.93
糖代謝	sucrose synthase	5.32	5.74

^b DW処理区と比較した際の発現強度の倍数

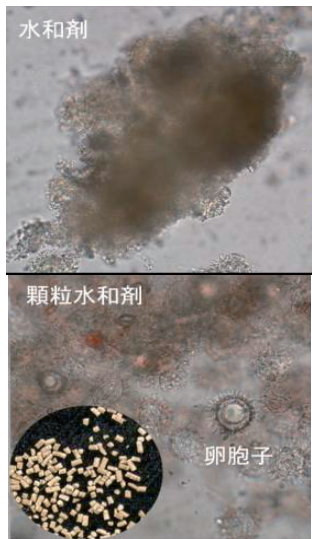
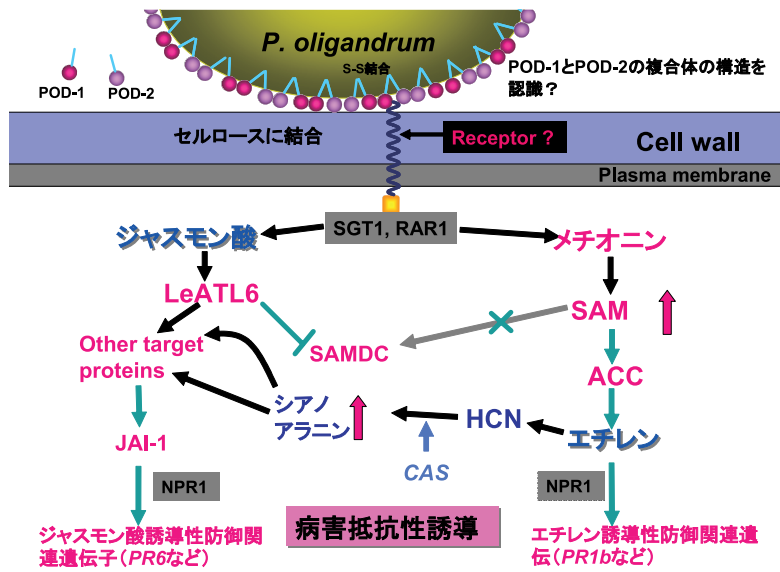


図7 水和剤と顆粒水和剤を水に溶解した時の卵胞子分散の様子

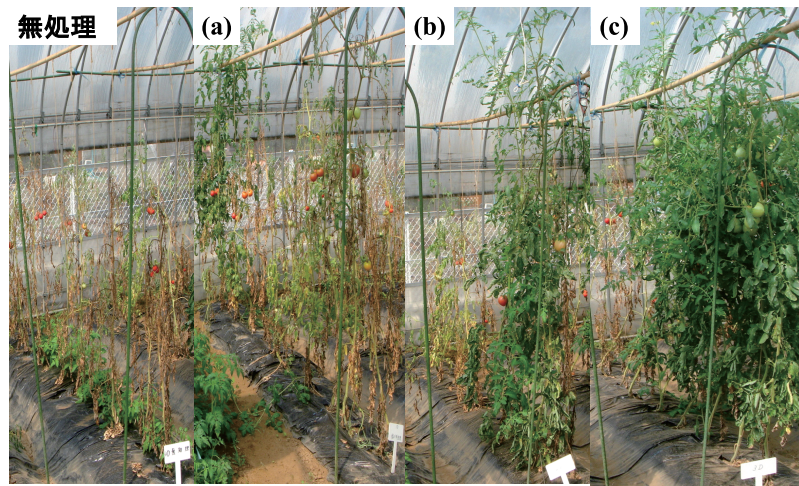


図8 トマト青枯病に対するPOの防除効果（鉢上げ後91日、定植後65日）

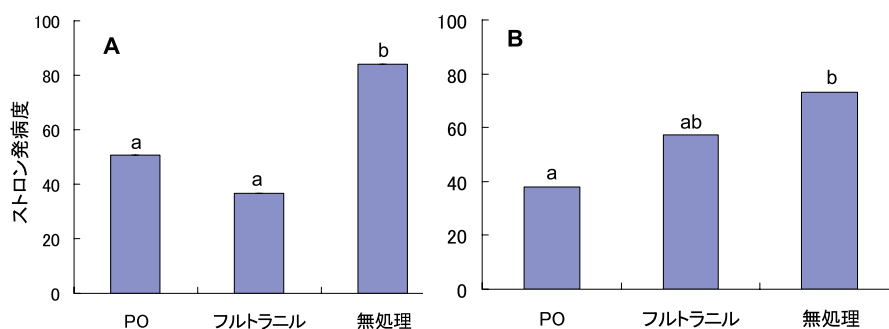


図9 種いも伝染(A)および土壌伝染(B)のジャガイモ黒あざ病に対するPOの防除効果

注：Tukey法により、同一アルファベットは有意差がないことを示す。