

赤かび毒分解細菌を用いた植物病害防除に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科

植物生産科学専攻（植物病理学）

森村 洋行

要約

コムギやオオムギの赤かび病は赤かび病菌 *Fusarium graminearum* (Fg) species complex によって引き起こされる世界的に被害が深刻な最重要病害の一つである。発病した小穂では穀粒の肥大化の阻害や穂枯れが生じ、品質、収量が低下するとともに、穀粒にかび毒が蓄積する。赤かび病の発生は、日本、北米、欧州などの温帯地域を中心として報告されており、その経済的被害は大きい。アメリカ合衆国では、かび毒を含めた赤かび病による経済的損失は 1990 年代の 10 年間で 30 億ドルにも及んだと報告されている。穀粒中のかび毒汚染は世界各国で注目されており、日本、アメリカ合衆国、カナダ、EU、オーストラリア、中国などがそれぞれ独自のかび毒の含有制限を設けている。さらに、近年の世界各地での気候変動による赤かび病の被害拡大が懸念されており、特に収穫後のかび毒蓄積が増大するリスクを大きくさせている要因の一つとなっている。赤かび病菌が産生するかび毒の中でも最も高頻度で検出されるのはデオキシニバレノール (Deoxynivalenol, DON) であり、DON は人間や家畜にも毒性を示す。比較的高濃度の DON を人畜が摂取すると、嘔吐や下痢といった急性毒性症状が現れる。低濃度であっても長期の DON 摂取は、タンパク質の合成阻害が神経内分泌系、免疫系、成長ホルモン合成に異常をきたし、健康被害を引き起こす。日本（北海道、青森を除く）で発生する赤かび病菌はニバレノール (NIV) 産生菌の比率が高いと報告されている。NIV の毒性は DON よりも 10 倍高い

とされ、高温多湿である日本の気候では赤かび病が発生しやすいという点を踏まえると、DON だけではなく NIV についても管理が必要である。以上の事から、単に植物病害を防除するだけではなく、かび毒汚染も同時に防ぐことが重要である。

本研究の目的は、DON 分解微生物を分離・選抜・機能解析し赤かび病発生と DON 蓄積の同時抑制法を構築するための知見を得ることである。本研究では、①新規 DON 分解細菌の機能解析、②DON 分解細菌の発症抑制効果と作用機作の検討、③DON 分解代謝変異株の機構解析の 3 つを行った。

①新規 DON 分解細菌の機能解析

新規分離細菌の DON 分解活性および DON 資化能試験を実施するとともに、NIV 分解活性の検証についても行った。新規細菌の DON 分解活性試験では、全ての菌株は DON MM で事前に培養することで、DON 分解が促進された。この現象は *Marmoricola* 属および *Sphingomonas* 属細菌株では今回初めて確認された。DON 資化能試験を行った結果、新規 DON 分解細菌では *Nocardioides* sp. HEM 株と *Marmoricola* sp. KOM 株が資化能を有していた。一方で、*Sphingomonas* sp. IMS 株には DON 資化能が認められなかった。先行研究では *Sphingomonas* sp. KSM1 株は DON 資化能を有するとの報告がある。この結果から同じ細菌属でも異なる DON 分解機構を有していることが示唆された。

新規細菌の NIV 分解活性を調査すると、*Nocardioides* 属細菌は DON で前培養することで NIV の分解速度は全ての菌種で促進されることも明らかにした。この現象は DON 分解機構が NIV 分解とも密接な関係を持っていると示唆している。*Sphingomonas* 属細菌に関しては、KSM1 株

が唯一の NIV 分解細菌として知られてきた。今回分離した IMS 株もまた NIV を分解したが、この IMS 株の NIV 分解活性は KSM1 株に比べて低かった。これは、KSM1 株と IMS 株は異なる NIV 分解能力を持っていることに起因するのかもしれない。*Marmoricola* sp. KOM 株もまた NIV 分解能を示し、事前に DON を含んだ培地に植菌することで NIV 分解が促進されたが、DON と比べて低い分解効率であった。

②DON 分解細菌の発症抑制試験

コムギ小穂での発症抑制試験を行い DON 分解細菌の応用に向けた研究を進めた。これと並行して、DON 分解細菌をコムギ小穂に接種した場合の代謝物の変化もモニタリングした。本研究では特に DON が赤かび病菌の植物体への感染戦略に重要な役割を持っていることに着目し、コムギ上で DON 分解しうる細菌が生物的防除資材として利用できる可能性を検討した。本試験では、2 品種（USU-Apogee と農林 61 号）のコムギ小穂上の発症抑制能力について解析した。USU-Apogee を採用した試験で AUDPC（Area under disease progress curve；病勢伸展曲線下部面積）を調べると、Fg 孢子懸濁液のみを処理した区と比べて、有意に低かった細菌処理区は *Devosia* sp. NKJ1 株、*Nocardioides* sp. SS3 株および SS4 株、*Sphingomonas* sp. KSM1 株であった。農林 61 号を用いた試験においては、AUDPC に有意な差が出たのは *Nocardioides* sp. SS3 株、WSN05-2 株、*Sphingomonas* sp. KSM1 属の細菌接種区であった。USU-Apogee と農林 61 号を使用した試験で共通して発症抑制効果が認められた DON 分解細菌は *Nocardioides* sp. SS3 株、*Sphingomonas* sp. KSM1 株であった。さらに、SS3 株と KSM1 株を接種したコムギ穀粒内の DON 濃度は有意差は確認できなかったが、Fg 単独接種コムギと比べて約半

分以下の DON 濃度であることを確認した。Fg がコムギ小穂上で感染を広げることができなかったことを考慮する必要があるが、DON 分解細菌接種によって DON 蓄積量が低下した事実を認められたのは非常に重要である。また、NIV 産生赤かび病菌として *Fusarium aisaticum* (Fa) を用いた発症抑制試験を実施した。その結果、DON 分解細菌は Fa による赤かび病発症も抑制した。特に農林 61 号を用いた試験では Fa によるコムギ赤かび病発症の規模は低かった。Fg のみを接種した農林 61 号でも低い AUDPC 値が算出されたため、品種による抵抗性の違いであると推測している。修士課程で確立したコムギ種子を使った Petri dish test との相関を調べた結果、USU-Apogee と農林 61 号の両品種ともに相関が認められた。特に農林 61 号の小穂を用いた試験との間には $r = 0.7 \sim 0.8$ と高い相関があることを示した。これは Petri dish test も同じ農林 61 号を用いて試験を実施したため、コムギ品種が検証結果に与えた影響を考慮する必要がある。Fa の発症抑制試験においても農林 61 号に関しては、 $r = -1, 0.98$ と非常に強い相関があるとされたが、点データが少ないことに留意する必要がある。

DON 分解細菌の発症抑制能力についてかび毒分解能力だけではなく、植物の免疫応答に作用していると考え、GC/MS を使用したコムギの代謝物解析を試みた。Fg や DON 分解細菌を接種した場合、コントロールと比較して代謝物の変化が認められた。発症抑制試験で効果が見られた SS3 株と KSM1 株を接種すると、Fructose、Glucose などの糖類、Proline、Norvaline、Glutamine、Glycine などのアミノ酸、Pentadecanoic acid、Octadecanoic acid、Myristic acid などの脂肪酸、Benzoic acid などの芳香族化合物の量が比較的多く存在していた。これらの代謝物は植物の防御応答に関わる物質として知られているため、DON 分解細菌が

コムギの免疫反応にポジティブな影響を及ぼしたと考えられる。

③DON 分解代謝変異株の機能解析

Nocardioides 属細菌の DON 分解代謝が低下した変異株を作出することで、DON 分解が赤かび病発症抑制に大きな役割を示すことと、DON 分解代謝遺伝子の推定を試みた。コムギ小穂を用いた赤かび病発症抑制試験において、*Nocardioides* sp. SS3 株が最も効果的であったため、SS3 株の機能を解析した。SS3 野生株を接種すると USU-Apogee に接種した場合は、赤かび病発症が抑制されていた。そして SS3 変異株を USU-Apogee に接種しても赤かび病を発症できないという結果になった。穀粒中の DON 蓄積量についても Fg 単独接種区よりも SS3 野生株接種区の方が DON 濃度は低かったが、SS3 変異株では同じ DON 濃度であったことから、SS3 変異株はコムギ小穂上で DON が分解できなかったと考えられる。よって DON 分解能が発症抑制に大きく貢献していると考えられるため、DON 分解細菌の DON 分解機構を詳しく調べる意義はとても大きいと言える。LS1 株のドラフトゲノムを参照ゲノムとして比較ゲノム解析を実行すると、aldo/keto reductase や enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein などに変異が発生していることが分かった。これらは *Nocardioides* 属細菌の薬剤分解代謝に関与する遺伝子として報告されているため、DON 分解代謝遺伝子の推定に一步近づけたと考えられる。

本研究では DON 分解細菌による赤かび病発症抑制の実証および DON 分解代謝遺伝子の推測を行った。DON 汚染および赤かび病抑制を防除する技術に向けた研究開発を行う上で、本研究結果が貴重な知見となると考える。