

学 位 論 文 題 名

アブラナ科植物と微生物の相互作用に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、植物防疫において環境への負荷の軽減を目指した微生物利用技術が脚光を浴びているが、植物病原菌を抑制する目的で市販の微生物資材を利用しても、期待した効果が現れないことが少なくない。これらは、資材中の微生物の植物根圏への定着や根圏での生態に関する、微生物を利用するために必要な基礎的知識の不足によるものと判断され、このような知識の蓄積が、より効果的な微生物利用技術の開発に極めて重要であると考えられる。

そこで本研究では、アブラナ科植物を例にとり、根圏微生物が植物の二次代謝産物によって受ける影響、根圏微生物が植物の生体防御に対して与える効果、宿主植物の特徴的な二次代謝産物を代謝する能力が根圏微生物に与える影響に関する基礎的な知見を得ることを目的とした。

1. アブラナ科植物の二次代謝産物による根圏微生物の選抜

セイヨウアブラナ、カラシナ、キレハイヌガラシ、コショウソウの4種のアブラナ科植物の根面および根内に高頻度に生息している糸状菌として、根面からは、植物の分泌物に依存して生育する微生物を分離するための Survival Method を新しく考案し、*Rhizopus* 属糸状菌を分離した。また、根内からは *Fusarium* 属糸状菌を分離した。これらの分離糸状菌株と、非アブラナ科植物からの分離糸状菌株を用いて、アブラナ科植物由来の抗菌物質に対する耐性を比較検討した。その結果、*Rhizopus* 属糸状菌は分離源にかかわらずアブラナ科植物の抗菌物質に対して耐性を示したが、*Fusarium* 属糸状菌ではアブラナ科植物由来の分離菌株の方が非アブラナ科植物由来の分離菌株よりも高い耐性を示した。*Rhizopus* 属、*Fusarium* 属ともにアブラナ科植物由来の抗菌物質に対して耐性をもった菌株がアブラナ科植物の根圏から高頻度で分離されたことから、アブラナ科植物の根圏では宿主植物の二次代謝産物（抗菌物質）による根圏微生物の選抜が起こっているものと結論した。

次に、アブラナ科植物の抗菌物質に対する耐性を調べた菌株について、アブラナ科植物の特徴的な二次代謝産物である glucosinolate（抗菌物質の前駆体）を isothiocyanate（抗菌物質）に加水分解する myrosinase 活性の有無の検討したところ、*Rhizopus* 属糸状菌ではセイヨウアブラナ根面から分離した Bn-R-1-1 株、*Fusarium* 属糸状菌ではコショウソウ根内から分離した Ls-F-in-4-1 株にそれぞれ活性が見られた。これらの菌株はアブラナ科植物の抗菌物質に対して高い耐性をもつことから、アブラナ科植物の根圏において宿主植物から放出される glucosinolate を積極的に isothiocyanate に加水分解し、自身はあまり阻害を受けずに周りの他の微生物の生育を抑える「武器」として利用しているものと考えられた。

2. 根圏定着性 *Fusarium* 属糸状菌による宿主植物の病原抵抗性の上昇

アブラナ科植物の根圏において優占的に生息していると考えられた *Rhizopus* 属および *Fusarium* 属の糸状菌が植物にどのような影響を与えているかを調べるために、コショウソウに立枯れを起こす病原菌 *Pythium ultimum* との共接種試験を行った。この結果、キレハイヌガラシ根内から分離した *Fusarium* 属糸状菌 Rs-F-in-11

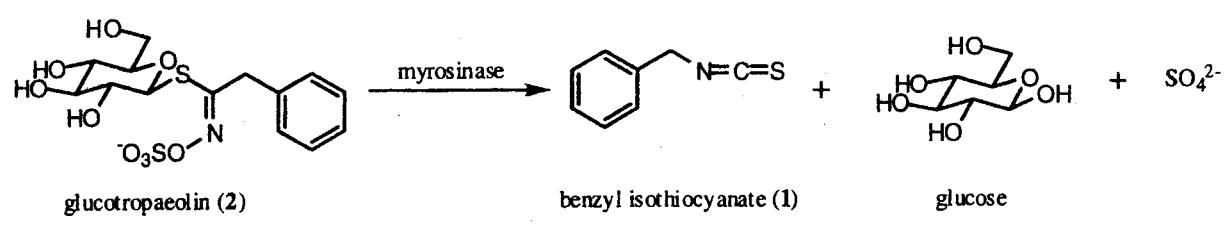
株と *P. ultimum* を共接種した区ではコショウソウの病原抵抗性が上昇したが、キレハイヌガラシ根面から分離した *Rhizopus* 属糸状菌 Rs-R-11 株にはこのような効果は見られなかった。次に、接種する *Fusarium* 属糸状菌の myrosinase 活性の有無によって宿主植物に対する病原抵抗性の誘導に差があるかどうかを検討した。その結果、myrosinase 活性のある Ls-F-in-4-1 株共接種区および myrosinase 活性のない Rs-F-in-11 株共接種区の双方でコショウソウの生存率が上昇し、両共接種区間に効果の大きな差は見られなかった。この *Fusarium* 属糸状菌の接種による病原抵抗性の上昇がどのようなメカニズムによるものかを調べるために、コショウソウ地下部に含まれる主要な抗菌物質である benzyl isothiocyanate (1) とその前駆体である glucotropaeolin (2) の定量を行ったところ、無接種区では約 0.10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 新鮮重であった benzyl isothiocyanate の量が、myrosinase 活性菌 Ls-F-in-4-1 株接種区では 0.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、myrosinase 不活性菌 Rs-F-in-11 株接種区では 0.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ と増加していることが分かった。また、無接種区では地下部における glucotropaeolin の量は約 3.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 新鮮重であったが、Ls-F-in-4-1 株接種区では 4.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、Rs-F-in-11 株接種区では 3.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ と増加していた。Glucotropaeolin 量の上昇がそれほど大きくなかった Rs-F-in-11 株接種区でも有意にコショウソウの生存率が上昇することから、抵抗性の上昇には *Fusarium* 属糸状菌の接種によるコショウソウ地下部での benzyl isothiocyanate 量の上昇がより大きく関与しているものと考えられた。

3. Myrosinase 活性微生物のアブラナ科植物根圏への定着

植物根圏における myrosinase 活性菌の分布を調べるために、水中分画法によって採集した 4 種のアブラナ科植物および 5 種のアブラナ科植物の根圏土壌希釈水を接種源として根圏微生物を混合培養し、myrosinase 活性を検討したが、全ての植物の根圏土壌微生物の混合培養区に活性が確認されたことから、myrosinase 活性をもつ微生物は広く植物の根圏に存在していると考えられた。一方、myrosinase による加水分解を受けることにより黄色の呈色を示す試薬 DNPT(2,4-dinitrophenyl-1-thio- β -D-glucopyranoside)を用いた一次スクリーニングを行い、DNPT 代謝能の見られた菌株について myrosinase 活性の有無を検討した結果、アブラナ科植物由来の菌株では DNPT 代謝能の見られた 10 菌株のうち、6 菌株に myrosinase 活性が確認されたが、非アブラナ科植物由来の菌株では、DNPT 代謝能の見られた 15 菌株のうち、3 菌株しか myrosinase 活性が確認されず、myrosinase 活性菌はアブラナ科植物の根圏により高い頻度で分布しているものと考えられた。

最後に、myrosinase 活性をもつ微生物が実際にアブラナ科植物の根圏に定着し、優位に生育できるかどうかを検討するために、農場で採取した土壌に myrosinase 活性菌 Ls-F-in-4-1 株を接種し、この土壌を入れたプランターで 30 日間生育させたコショウソウとレタスの根面微生物を可能な限り分離し、全分離菌株中の myrosinase 活性菌の出現率を比較した。その結果、myrosinase 活性菌 Ls-F-in-4-1 株無接種ではコショウソウ根面で 13%、レタス根面で 14%と、ともに同じくらいの出現率であったが、Ls-F-in-4-1 株接種区ではコショウソウ根面で 23%、レタス根面で 17%と、コショウソウ根面の方が出現率が高くなった。Glucosinolate を添加した寒天平板上での対峙培養試験では、glucosinolate の存在下においてのみ myrosinase 活性菌 Ls-F-in-4-1 株による *P. ultimum* の生育の抑制が観察されたこととあわせて考えると、アブラナ科植物根圏においては myrosinase 活性菌が宿主植物の根に由来する glucosinolate を加水分解し、*P. ultimum* のような isothiocyanate 感受性の微生物の生育を抑え、優位的に生育しているものと考えられた。

以上のように、アブラナ科植物の根圏では、①植物の二次代謝産物による根圏微生物の選抜が起きている、②優占的に生育する微生物の中には、植物の生体防御に関与するものが存在する、③植物の二次代謝産物を利用し、根圏において優位に生息する微生物が存在する、ことが分かった。これらの知見を基礎として、より効果的な微生物資材の開発が可能になるものと期待される。



学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 原 哲 士

副 査 教 授 吉 原 照 彦

副 査 講 師 福 士 幸 治

学 位 論 文 題 名

アブラナ科植物と微生物の相互作用に関する研究

本論文は、和文 96 頁、図 32、表 31、6 章からなり、他に参考論文 1 編が付されている。

近年、植物防疫において環境への負荷の軽減を目指した微生物利用技術が脚光を浴びているが、植物病原菌を抑制する目的で微生物資材を用いても、期待した効果が現れないことが少なくない。これらは、当該微生物を利用するために必要な植物根圏への定着性や根圏での生態に関する基礎的知識の不足によるものと判断され、この種の知識の蓄積が、より効果的な微生物利用技術の開発に極めて重要と考えられる。

著者は、アブラナ科植物を例に、根の分泌物に依存して生育する微生物の分離法や、アブラナ科植物の特徴的代謝産物カラシ油配糖体の加水分解酵素であるmyrosinase活性発現微生物のスクリーニング法を考案、応用して根圏微生物が植物の二次代謝産物によって受ける影響、根圏微生物が植物の生体防御に対して与える効果、宿主植物の特徴的な二次代謝産物を代謝する能力が根圏微生物に与える影響を解析し、以下の結果を得ている。

1. アブラナ科植物の二次代謝産物による根圏微生物相の制御

アブラナ科植物セイヨウアブラナ、カラシナ、キレハイヌガラシ、コショウソウの根面および根内に高頻度に生息している糸状菌として、根面からは*Rhizopus*属菌を、根内からは*Fusarium*属菌を分離した。これらの分離菌株と、非アブラナ科植物からの分離糸状菌株を用いて、アブラナ科植物由来抗菌物質のカラシ油類に対する耐性を比較した結果、*Rhizopus*属糸状菌は分離源にかかわらず耐性を示したが、*Fusarium*属糸状菌ではアブラナ科植物由来の分離株が他科植物由来の菌株より高い耐性を示した。*Rhizopus*属、*Fusarium*属ともにアブラナ科植物の抗菌物質に対して耐性の高い菌株がアブラナ科植物の根圏から高頻度で分離されたことから、アブラナ科植物の根圏では宿主植物の二次代謝産物(抗菌物質)による根圏微生物の選抜が起こっているものと結論した。

次に、分離菌のmyrosinase活性の有無を調べたところ、*Rhizopus*属糸状菌ではセイヨウアブラナ根面から分離したBn-R-1-1株、*Fusarium*属糸状菌ではコショウソウ根内から分離した*Fusarium oxysporum*にそれぞれ活性が見られた。これらはアブラナ科植物の抗菌物質に対して高い耐性をもつことから、アブラナ科宿主植物から放出されるカラシ油配糖体を積極的にカラシ油に加水分解し、自身はあまり阻害を受けずに周りの他の微生物の生育を抑える「武器」として利用しているものと考えられた。

2. 根圏定着性*Fusarium*属糸状菌による宿主植物の病原抵抗性の上昇

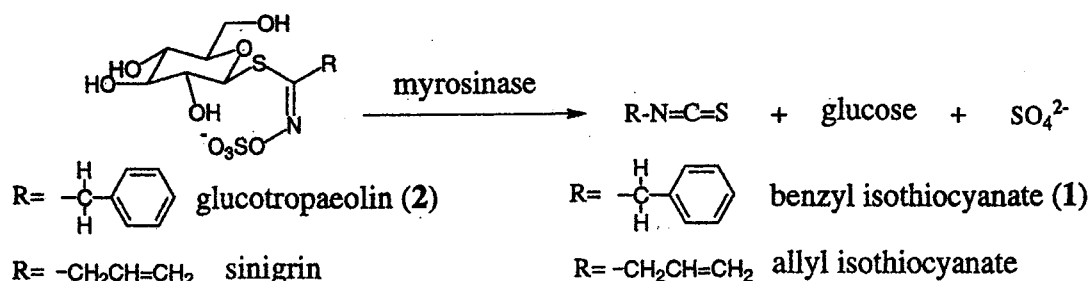
アブラナ科植物の根圏で優占的に生息している*Rhizopus*属あるいは*Fusarium*属の糸状菌と立枯れ病原菌*Pythium ultimum*の相互関係を調べるため、コショウソウに共接種を行った。キレハイヌガラシ根内から分離した*Fusarium moniliforme*と*P. ultimum*を共接種した区ではコショウソウの病原抵抗性が上昇したが、同植物の根面から分離した*Rhizopus oryzae*は効果が見られなかった。また、非病原性*Fusarium*属菌の接種によるコショウソウの病原抵抗性の亢進にmyrosinase活性の有無が直接には関係ないことを、上記*F. moniliforme* (myrosinase活性なし)と*F. oxysporum* (myrosinase活性有り)を用いた比較実験で明らかにした。この*Fusarium*属菌の接種による病原抵抗性の上昇のメカニズムを探るためコショウソウ地下部に含まれる主要な抗菌物質であるbenzyl isothiocyanate (1)とその前駆体であるglucotropaeolin (2)の定量を行ったところ、無接種区では約0.10 µg/mg新鮮重であった化合物1が、*F. oxysporum*接種区では0.25 µg/mg、*F. moniliforme*接種区では0.20 µg/mgと有意に増加していた。また、配糖体(2)の量も両菌の接種区で増加傾向は見られたが抵抗性亢進との相関は明らかではなく、抵抗性の上昇には*Fusarium*属糸状菌の接種によるコショウソウ地下部でのカラシ油(1)の量の上昇がより大きく関与しているものと考えられた。

3. Myrosinase活性微生物のアブラナ科植物根圏における分布と定着性

水中分画法によって採集した4種のアブラナ科植物および5種の非アブラナ科植物の根圏土壌希釈水を接種源として混合培養した場合は、全ての区分でカラシ油配糖体のひとつsinigrinが加水分解されたことより、myrosinase活性を持つ微生物は植物の根圏に広く分布していると考えられた。一方、myrosinaseおよびその他の一部の酵素で加水分解されて黄色の呈色を示す試薬DNPT(2,4-dinitrophenyl-1-thio-β-D-glucopyranoside)を用いた一次スクリーニングを行い、DNPT分解能のある菌株についてsinigrin分解活性の有無を調べた結果、アブラナ科植物由来の菌株ではDNPT代謝能の見られた10菌株のうち、6菌株に、非アブラナ科植物植物由来の菌株では、同15菌株のうち、3菌株しかmyrosinase活性が確認されず、myrosinase活性菌はアブラナ科植物の根圏により高い頻度で分布していることが分かった。

Myrosinase活性をもつ微生物が実際にアブラナ科植物の根圏に定着し、優位に生育できるかどうかを検討するために、農場で採取した土壌にmyrosinase活性菌*F. oxysporum*を接種しコショウソウとレタスを30日間生育させ根面・根内微生物を可能な限り分離し、全分離菌株中のmyrosinase活性菌の出現率を比較した。その結果、無接種区のコショウソウ根面では13%、レタス根面で14%と、ともに同じくらいの出現率であったが、接種区ではコショウソウは23%、レタスは17%と、コショウソウの方が高い傾向が見られた。

また、対峙培養では、カラシ油配糖体を添加した寒天平板上でのみmyrosinase活性菌によって*P. ultimum*の生育抑制が観察された。これらを総合して考えるとアブラナ科植物根圏ではmyrosinase活性菌が宿主植物由来のカラシ油配糖体を加水分解し、*P. ultimum*のようなカラシ油感受性の微生物の生育を抑え、優占的に生育しているものと考えられた。



以上のように、本研究はアブラナ科植物の根圏における微生物との相互作用を生態化学的視点から解析したもので、得られた知見は、生態系に見られる植物・微生物複合系への理解を深めたのみならず、土壌病原菌制御のための微生物資材の開発や有効利用に重要な示唆を与えるものであり、その成果は関連分野において高く評価されている。

よって審査員一同は、石本 洋が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。