

学位論文題名

Screening of rhizobacteria antagonistic against phytopathogenic Peronosporomycetes, and further microscopic investigation of their effects on the morphophysiology of the pathogens

（植物病原性卵菌類に対して拮抗性を示す根圏細菌の検索と、それら拮抗細菌が病原菌に及ぼす形態生理的影響の顕微鏡的検証）

学位論文内容の要旨

Peronosporomycetes（卵菌類）はかつて真菌に分類されていた褐藻類に近い仲間で、幾つかの土壤伝播性病原菌、例えば *Phytophthora*、*Pythium* および *Aphanomyces* といった、苗立ち枯れ病や根腐れ病を引き起こす重要な植物病原菌を含む。それらのうち、本研究に用いた *Aphanomyces cochlioides* はハウレンソウなどアカザ科植物に特異的に寄生し、その生活環のなかに、2本の鞭毛を有する遊走子世代を持っている。遊走子は、宿主植物が根から放出している化合物を宿主認識のための誘引物質として用いており、既に単純なフラボンである cochliophilin A がハウレンソウとアカザの特異的 *A. cochlioides* 誘引物質として単離・構造決定されている¹⁾。本研究は、植物病原性卵菌類に対して拮抗性を示す根圏細菌を宿主および非宿主植物、特にアーバスキュラー菌根非形成植物（アカザ科、タデ科、アブラナ科）から検索し、それら拮抗細菌が病原菌菌糸の形態および生理にどのような影響を及ぼすかについて、顕微鏡的検証を試みたものである。研究は大きく4部に分かれるが、それぞれはお互いに関連しあったものであるため、考察は一括して行った。

1. 拮抗性細菌のスクリーニングと、被検菌である対峙 *Peronosporomycetes* 菌糸の多様な形態変化の観察

札幌域に生育する宿主植物およびその周辺の非宿主植物根圏から根圏細菌 157 株を分離し、これらをそれぞれ *A. cochlioides* 菌糸との対峙培養に供した。その結果、全菌株中 8 株（5%）が強力な菌糸伸長抑制活性を示し、またそれらの多くが菌糸の形態分化に異常を誘発した。16S rRNA 遺伝子配列の解析とその相同性検索から、これら 8 菌株の同定を試みた。その結果、 γ -プロテオバクテリアに属する 7 菌株を、*Pseudomonas* sp. 2 株、*Stenotrophomonas* sp. 2 株、*Klebsiella oxytoca* 2 株および *Delftia* sp. 1 株とそれぞれ仮同定した。さらに、グラム陽性細菌である *Bacillus subtilis* を 1 株同定した。これらの中で、*Pseudomonas* sp. EC-S101 株は他の菌株に比べて極めて特徴的な *Peronosporomycetes* 菌糸の異常分岐を誘導した²⁾。

2. *Aphanomyces cochlioides* 生育抑制活性を示す *Pseudomonas* sp. EC-S101 株による菌糸異常形態分化の誘導

Pseudomonas sp. EC-S101 株と対峙した *A. cochlioides* AC-5 株や *Pythium aphanidermatum* PA-5 株は、カリフラワー状になる異常分岐を示したため、分岐誘導頻度を経時的に追い、この異常分岐がどのように進行するかを追跡した。低倍率（ $\times 100$ ）の光学顕微鏡下で視野を固定し、2時間おきに10時間までデジタル画像を記録した。この画像を画像処理にかけ、分岐節（nod）数をカウントした。その結果、総菌糸伸長距離は時間の経過とほぼ正の1次相関を

示した。この異常分岐がどのような細胞生理学的な変化を伴っているかを調べるため、各種オルガネラの特異的蛍光染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察、さらには走査電顕と透過型電顕による微細構造の可視化を試みた。核染色の結果、該当する異常分岐菌糸ではその分岐菌糸の全てに核が存在し、正常もしくはそれよりも早いペースで有糸分裂が起こっていることが示唆された。そのため、同じプレートで対照区の菌糸を顕微的に追いかけて、正常菌糸の分岐頻度と核数を処理区のものと比較してみた。その結果、対照区と処理区の両方で、nod数と核数は高い相関係数を保ちながら常に正の1次相関の関係にあることが分かった。そのため、nod数を使って再度、時間と有糸分裂との関係を探ったところ、対照区では10時間までほぼ直線的にnod数(=有糸分裂頻度)が時間との正相関を示すのに対し、処理区では4時間まで対照区のおよそ2倍の頻度の有糸分裂速度を示し、その後10時間まで対照区と同じ有糸分裂速度を示すことが明らかにされた。従って、*Pseudomonas* sp. EC-S101株との対峙培養に起因するPeronosporomycetes菌糸異常分岐では、菌糸の伸長機能は停止しているものの、有糸分裂は盛んに行われていることが分かった。フラクタル構造をもった菌糸の異常形態は、活性のある根圏細菌本体による有糸分裂促進効果によって加速的に誘導されることが示された。

3. *Pseudomonas* sp. EC-S101株およびその他の拮抗細菌による異常菌糸の細胞生理学的検証

各種オルガネラの特異的蛍光染色を用いた共焦点レーザー顕微鏡観察と形態異常を起こした菌糸の走査電顕ならびに透過型電顕による微細構造の検討を組み合わせることで、拮抗細菌によって、観察されたような形態異常を引き起こされた菌糸がどのような細胞生理機能影響を受けているのかを明らかにしようとした。その結果、多くの異常菌糸で細胞骨格をつくるF-actinの集合が阻害されていることが分かった。これは形態異常に直結するものと考えられた。また、異常分岐菌糸ではリポド体の増加と液胞への融合、ミトコンドリアの異常増加と形態の変化、核の萎縮と速やかな崩壊が認められ、これらは老化現象に伴う生理的变化に近いものであることが伺われた。

4. *Lysobacter* sp. SB-K88株の*A. cochlioides*感染阻止に関連した特異的な根面での付着機構と拮抗性発現

Lysobacter sp. SB-K88株は、北海道のテンサイそう根病激発圃場のテンサイ細根根面から分離された拮抗細菌で、強力な苗立枯れ病抑制活性を有する。SB-K88株は、液体培養において培地1リットル当たり3~10mgの効率でテトラミン酸型マクロラクタム抗生物質xanthobaccin Aを産生するが、菌糸が直接、テンサイ苗根面に付着した場合、その一定菌糸数当たり抗生物質産生能は2~10万倍高くなることが示されている。そこで、無菌テンサイ苗をホーランド・ジェランガムゲル上で育て、ここに接種したSB-K88株の根面での挙動を走査電顕で観察した。その結果、SB-K88は根面に対し、桿菌が垂直に立ち上がったような特徴的な付着・コロニー形成を行っていることが分かった³⁾。古い根では、立ち上がった菌糸集合体が完全にポリマーで包まれており、バイオフィーム化していることが推測された。このような特徴的な菌糸の付着は、桿菌の片側にのみ認められる絨毛(villus)によることが電顕観察によって明らかにされた。SB-K88菌糸のこのような付着は、宿主根面のみならず*A. cochlioides*菌糸面にも認められた。

xanthobaccin Aは*A. cochlioides*遊走子に対して0.01mM濃度でホーミングとそれに引き続く子のう胞子の崩壊を引き起こした。そのため、*Lysobacter* sp. SB-K88の高い拮抗性は、その根面への特徴的な付着とバイオフィーム化による抗生物質生産への特化、根面への高濃度の抗生物質の蓄積によることが推測された。

参考文献

- 1) T. Horio, Y. Kawabata, T. Takayama, S. Tahara, J. Kawabata, Y. Fukushi, H. Nishimura, and J. Mizutani. A potent attractant of zoospores of *Aphanomyces cochlioides* isolated from its host, *Spinacea oleracea*. *Experimentia*, **48**, 410-414 (1992).

- 2) A. Deora, Y. Hashidoko, M. T. Islam, and S. Tahara. Induction of hyphal morphological alteration – a criterion for the selection of antagonistic rhizoplane bacteria against soilborne phytopathogenic Peronosporomycetes. *European Journal of Plant Pathology*, **112**, 311-322 (2005).
- 3) M. T. Islam, Y. Hashidoko, A. Deora, T. Ito, and S. Tahara. Suppression of damping-off disease in host plants by rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne Peronosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 3786-3796 (2005).

学位論文審査の要旨

主査 助教授 橋 床 泰 之
副査 教授 田 原 哲 士
副査 教授 鍋 田 憲 助

学位論文題名

Screening of rhizobacteria antagonistic against phytopathogenic Peronosporomycetes, and further microscopic investigation of their effects on the morphophysiology of the pathogens

(植物病原性卵菌類に対して拮抗性を示す根圏細菌の検索と、それら拮抗細菌が病原菌に及ぼす形態生理的影響の顕微鏡的検証)

本論文は、英文 155 頁、図 45、表 8、5 章からなり、参考論文 7 編が付されている。

Peronosporomycetes (卵菌類) はかつて真菌に分類されていた褐藻類に近い仲間、幾つかの土壌伝播性病原菌、例えば *Phytophthora*、*Pythium* および *Aphanomyces* といった、苗立ち枯れ病や根腐れ病を引き起こす重要な植物病原菌を含む。それらのうち、本研究に用いた *Aphanomyces cochlioides* はハウレンソウなどアカザ科植物に特異的に寄生し、その生活環のなかに、2本の鞭毛を有する遊走子世代を持っている。遊走子は、宿主植物が根から放出している化合物を宿主認識のための誘引物質として用いており、既に単純なフラボンである cochliophilin A がハウレンソウとアカザの特異的 *A. cochlioides* 誘引物質として単離・構造決定がなされている。本研究は、植物病原性卵菌類に対して拮抗性を示す根圏細菌を宿主および非宿主植物、特にアーバスキュラー菌根非形成植物 (アカザ科、タデ科、アブラナ科) から検索し、それら拮抗細菌が病原菌菌糸の形態および生理にどのような影響を及ぼすかについて、顕微鏡的検証を試みたものである。

拮抗性細菌のスクリーニングと Peronosporomycetes 菌糸の多様な形態変化の観察

札幌域に生育する宿主植物およびその周辺の非宿主植物根圏から根圏細菌 157 株を分離し、これらをそれぞれ *A. cochlioides* 菌糸との対峙培養に供した。その結果、全菌株中 8 株 (5%) が強力な菌糸伸長抑制活性を示し、またそれらの多くが菌糸の形態分化に異常を誘発した。特に、16S rRNA 遺伝子配列の解析とその相同性検索から、これら 8 菌株の同定を試みた。その結果、 γ -プロテオバクテリアに属する 7 菌株を、*Pseudomonas* sp. 2 株、*Stenotrophomonas* sp. 2 株、*Klebsiella oxytoca* 2 株および *Delftia* sp. 1 株とそれぞれ仮同定した。さらに、グラム陽性細菌である *Bacillus subtilis* を 1 株同定した。これらうち、*Pseudomonas* sp. EC-S101 株は他の菌株に比べて極めて特徴的な Peronosporomycetes 菌糸の異常分岐を誘導した²⁾。

Pseudomonas sp. EC-S101 株による *Pythium aphanidermatum* PA-5 株菌糸異常形態分化の誘導

Pseudomonas sp. EC-S101 株と対峙した *A. cochlioides* AC-5 株や *Pythium aphanidermatum*

PA-5 株は、カリフラワー状になる異常分岐を示したため、分岐誘導頻度を経時的に追い、この異常分岐がどのように進行するかを追跡した。低倍率 (×100) の光学顕微鏡下で視野を固定し、2 時間おきに 10 時間までデジタル画像を記録した。この画像を画像処理にかけ、分岐節 (nod) 数をカウントした。その結果、総菌糸伸長距離は時間の経過とほぼ正の 1 次相関を示した。この異常分岐がどのような細胞生理学的な変化を伴っているかを調べるため、各種オルガネラの特異的蛍光染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察、さらには走査電顕と透過型電顕による微細構造の可視化を試みた。核染色の結果、該当する異常分岐菌糸ではその分岐菌糸の全てに核が存在し、正常もしくはそれよりも早いペースで有糸分裂が起こっていることが示唆された。そのため、同じプレートで対照区の菌糸を顕微的に追いかけて、正常菌糸の分岐頻度と核数を処理区のものと比較してみた。その結果、対照区と処理区の両方で、nod 数と核数は高い相関係数を保ちながら常に正の 1 次相関の関係にあることが分かった。そのため、nod 数を使って再度、時間と有糸分裂との関係を探ったところ、対照区では 10 時間までほぼ直線的に nod 数 (= 有糸分裂頻度) が時間との正相関を示すのに対し、処理区では 4 時間まで対照区のおよそ 2 倍の頻度の有糸分裂速度を示し、その後 10 時間まで対照区と同じ有糸分裂速度を示すことが明らかにされた。従って、*Pseudomonas* sp. EC-S101 株との対峙培養に起因する Peronosporomycetes 菌糸異常分岐では、菌糸の伸長機能は停止しているものの、有糸分裂は盛んに行われていることが分かった。菌体のフラクタル構造をもった異常形態は、活性のある根圏細菌本体による有糸分裂促進効果によって加速的に誘導されることが示された。

拮抗細菌による異常菌糸の細胞生理学的検証

各種オルガネラの特異的蛍光染色を用いた共焦点レーザー顕微鏡観察と形態異常を起こした菌体の走査電顕ならびに透過型電顕による微細構造の検討を組み合わせることで、拮抗細菌によって、観察されたような形態異常が引き起こされた菌糸がどのような細胞生理機能影響を受けているのかを明らかにしようとした。その結果、多くの異常菌糸で細胞骨格をつくる F-actin の集合が阻害されていることが分かった。これは形態異常に直結するものと考えられた。また、異常分岐菌体ではリポド体の増加と液胞への融合、ミトコンドリアの異常増加と形態の変化、核の萎縮と速やかな崩壊が認められ、これらは老化現象に伴う生理的变化に近いものであることが伺われた。

Lysobacter sp. SB-K88 株の特異的な根面での付着機構と拮抗性発現

Lysobacter sp. SB-K88 株は、北海道のテンサイそう根病激発圃場のテンサイ細根根面から分離された拮抗細菌で、強力な苗立枯れ病抑制活性を有する。SB-K88 株は、液体培養において培地 1 リットル当たり 3~10 mg の効率でテトラミン酸型マクロラクタム抗生物質 xanthobaccin A を産生するが、菌体が直接、テンサイ苗根面に付着した場合、その一定菌体数当たり抗生物質産生能は 2~10 万倍高くなることが示されている。そこで、無菌テンサイ苗をホーグランド・ジェランガムゲル上で育て、ここに接種した SB-K88 株の根面での挙動を走査電顕で観察した。その結果、SB-K88 は根面に対し、桿菌が垂直に立ち上がったような特徴的な付着・コロニー形成を行っていることが分かった³⁾。古い根では、立ち上がった菌体集合体が完全にポリマーで包まれており、バイオフィーム化していることが推測された。このような特徴的な菌体の付着は、桿菌の片側にのみ認められる絨毛 (villus) によることが電顕観察によって明らかにされた。SB-K88 菌体のこのような付着は、宿主根面のみならず *A. cochlioides* 菌糸面にも認められた。xanthobaccin A は *A. cochlioides* 遊走子に対して 0.01 mM 濃度でホーミングとそれに引き続く子のう胞子の崩壊を引き起こした。そのため、*Lysobacter* sp. SB-K88 の高い拮抗性は、その根面への特徴的付着とバイオフィーム化による抗生物質生産への特化、根面への高濃度の抗生物質の蓄積によることが推測された。

以上のように本研究は、拮抗微生物による植物病原性卵菌類の抑制に重要な知見を与えるものである。特に、その抑制に係る形態生理学的変化を顕微的に可視化することに成功し、これを指標として拮抗性の作用機作を細胞生理学的に解析できるということを示した。

見いだした成果は、生物合理的微生物防除研究において大変意義深いものである。

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