

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 13 年度 博士課程進学

氏 名 赫 宇 曦

指導教官名 小柳津 広志

論文題目 蛍光性 *Pseudomonas* HP72 株の植物病害防除メカニズムの解明

植物病害はその原因によって、伝染性または非伝染性の二つに大別される。伝染性の病気は糸状菌、細菌、マイコプラズマ、ウイルス、ウイロイドなどによって起こる。現在のところ、伝染性の植物病害防除には農薬（殺菌剤など）が最も一般的に使用されているが、その他、耕種的防除法、物理的防除法、及び生物的防除法もある。農業の生産性の向上を目指して開発された化学合成農薬は、高性能、安価、長期保存可能といった利点から広く使用されている一方、農薬の過度な使用は水質汚染、土壌汚染、農作物への残留などの理由から、人体への毒性、持続的農業への悪影響が危惧されている。特に、ゴルフ場で使用された芝草は一般の農作物と異なり、その利用の目的上、ほぼ一年間を通して生育を良好に維持する必要があり、また、輪作、混作ができないといった理由から、一般農作物と比較して農薬の散布期間が長くなるのが現状である。そのため、ゴルフ場の農薬散布による環境汚染は一般農作物の栽培に使用される農薬による汚染よりも大きくクローズアップされることとなり、社会的に問題視されている。従って、減農薬、環境保全型の農薬が課題とされている今、農薬にかわる有効な植物病害防除法の確立が必要となっている。近年、様々な防除法の中、拮抗微生物による生物防除法が注目され、積極的な研究が行われた。しかしながら、一般の畑作物を対象にした土壌病害の生物的防除に関する研究は積極的に行われているが、ゴルフ場における芝草病害の生物防除の研究は、一般農作物に比べて少ない、特に病害防除のメカニズムに関する研究はほとんどないのが現状である。

蛍光性 *Pseudomonas* HP72 株は、芝草病害 Brown patch の防除を目的とし、芝草病原

性糸状菌に対して拮抗性を持つ菌株としてスクリーニングされてきた。HP72 株は 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl)、HCN、fluorescent siderophore などの拮抗物質を生産し、イネ科植物（シバ、オオムギ、コムギなど）によく定着することが明らかになっている。そこで、本研究では、上述拮抗物質に着目し、HP72 株の芝草病害防除メカニズムを解明することを目的とした。

1. *Pseudomonas fluorescens* HP72 株が生産した抗生物質 Phl は芝草病害防除において、重要な役割を示した。

HP72 株へトランスポゾン遺伝子を導入することによって作られたランダム変異株の中から、芝草病原菌の *Rhizoctonia solani* AG 2-2 IIIB との対峙培養で拮抗能を欠失した株、5 株をスクリーニングした。これら 5 株は、*Rhizoctonia solani* AG2-2 IIIB の他、他の芝草病原菌である *Pythium aphanidermatum*、*Sclerotinia homoeocarpa* に対しての拮抗能も失っていた。HP72 株および拮抗能欠損株 5 株の培養液抽出物を薄層クロマトグラフィーで解析した結果、5 株とも 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) を生産しなかったことから *in vitro* での Phl の重要性が示唆された。また、5 株がすべて蛍光性 siderophore 生産能を欠失していないことや、5 株の中 2 株が HCN を生産したにも関わらず、拮抗能を失った事から、HP72 株において、蛍光性 siderophore 及び HCN の生産は少なくとも *in vitro* での拮抗性には関与しないと考えられた。HP72 株による *in vitro* での拮抗性には、Phl が重要な因子であり、他の拮抗物質の可能性は低いことが示唆された。また、野生株、Phl 生産能しか欠失していない変異株の HP72-52、HP72-679 について病害防除能を調べた結果、HP72-52 株、HP72-679 株の病害防除能は野生株に比べ、低下することが確認された。HP72-52 株、HP72-679 株の定着能は野生株とほとんど変化はなかったため、病害防除能の低下は Phl 生産能の欠損によるものであることが示唆された。よって、これまでに Q2-87 株のコムギ立ち枯れ病防除や CHA0 株のタバコ黒根病防除において、Phl が重要であることが示された結果と同様であり、HP72 株による brown patch 病害防除における Phl 生産の重要性が示唆された。

2. 抗生物質 Phl 生産に関与する遺伝子の単離

HP72 株において、Phl の生産制御システムを研究するため、HP72 株や Phl 非生産の変異株 HP72-52、HP72-679 から、Phl 生産に関連する遺伝子の単離を試みた。これまでに、生物防除研究に用いられた *P. fluorescens* Q2-87 株、F113 株および CHA0 株などの菌株から Phl 合成遺伝子群が単離され、その Phl 合成遺伝子の部分配列が報告された。そこで、単離された推定 Phl 合成遺伝子群の配列相同性を基に、プライマーを作製し、HP72 株の全ゲノムを鋳型とする PCR により Phl 合成遺伝子の配列を増幅した。その結果、Phl 合成遺伝子とされる *phlA*、*phlC*、*phlB*、*phlD*、転写リプレッサータンパク質をコードする遺伝子とされる *phlF* および放出タンパク質をコードする遺伝子とされる *phlE* が単離された。また、PhlACBDF 部分の推定アミノ酸配

列について、Q2-87 株や F113 株と 90%以上の高い相同性を示したが、CHA0 株とやや低い 80%の相同性を示した。次に、ゲノムライブラリの作製および PCR 増幅などの遺伝子単離手法を用い、HP72-52 株や HP72-679 株から、トランスポゾン遺伝子 Tn5 挿入部位の周辺遺伝子を単離し、塩基配列を決定した。この結果、すべての Tn5 周辺遺伝子領域は、Phl 合成遺伝子群との関連性は見られなかった。さらに、相同性組換えにより変異株を作製し、単離した遺伝子から Phl 合成と関連する部分を絞り出した。その結果、HP72-679 株から一つの Phl 生産と関連する、約 557 推定アミノ酸を含む open reading frame が確認された。それは、*P. putida* の GntR family 転写因子と 63%の相同性を示した。今までの GntR family 転写因子に関する研究報告によると、GntR family タンパク質は炭素代謝において、カルボン酸塩を有する触媒タンパク質のリプレッサーとして働くことが多い、また、転写促進因子として働く報告もある。HP72-52 株については、5つの open reading frame が確認され、一つのオペロンになっていると推定された。その中、推定 3-Alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (73%)、推定 BNRdomain protein (44%)、推定トランスポータータンパク質(63%)などに相同性を示したことから、炭素代謝、栄養利用または物質輸送に関わると推定できる。

3. Phl 生産制御システムについての研究

これまでに知られている Phl の生産制御因子については、Phl 合成遺伝子群の 1 つのタンパク質である PhlF が負の制御をすることが知られている他は、2 次代謝物全般に関わる代謝制御因子と Phl 生産性との関連性を指摘する報告しかないため、Phl 非生産株である HP72-52、HP72-679 で破壊された領域が、Phl 生産を特異的に制御することは興味深い。ノザンプロット解析および RT-PCR 解析の結果から、二つの Phl 非生産変異株では、Phl 合成遺伝子の転写が抑制されていることがわかった。さらに、相同性組換えにより HP72 株、HP72-52 株、HP72-679 株の *phlF* 変異株を作製し、RT-PCR 解析および培養液抽出物の TLC 解析を行った。その結果、Phl 非生産株での Phl 合成遺伝子の転写が回復され、野生株の Phl 生産能が大幅に増加した。しかし、HP72-52 株や HP72-679 株の Phl 生産能は、全く回復されていなかった。また、今まで生産しなかった、Phl の生産と密接に関わるとされている褐色色素が生産された。その褐色色素の正体はまだ不明だが、Phl 生産菌から共通に生産され、Phl 生産に生じた一つの間産物と考えられている。よって、HP72-52 株、HP72-679 株で破壊された領域の遺伝子がリプレッサータンパク質 PhlF を通じて Phl 合成遺伝子の転写に影響する一方、別の制御システムで Phl の生産を制御することが示唆された。また、Phl 非生産株の培養液抽出物を GS-MS で解析した結果、Phl 前駆体とされる MAPG の生産もされていなかったことから、それらの遺伝子は Phl 合成遺伝子を発現レベルで制御するか、または MAPG のさらなる前駆体の生産に関わるかと考えられる。

次に、quorum sensing に関わる Phl 生産制御システムの研究を行った。quorum sensing システムはグラム陰性菌に普遍的に存在し、二次代謝物の生産、細胞外酵素の分泌を誘導するシステムである。特に、AHLs 依存の quorum sensing システムは拮抗微生物と植物病原菌の両方に存在し、生物防除において特殊な存在である。すなわち、quorum sensing システムを巧みに利用することも生物防除の一つの手法である。HP72 株について、培養液の上清からシグナル因子 AHLs は検出できなかったが、King's B 培地へこの上清抽出物を添加すると、HP72 株の生育が著しく遅くなり、また Phl の生産と合成遺伝子の転写が促進されたことから、AHLs 以外のシグナル因子が存在する可能性を示唆した。

総括

Pseudomonas fluorescens HP72 株生産した抗生物質 2,4-diacetylphloroglucinol は、芝草病害防除において重要な役割を果たすことが本研究で証明された。また、Phl 生産と関連する新しい遺伝子が単離され、これらの遺伝子はリプレッサータンパク質 PhlF を通じて、Phl 合成遺伝子の転写に影響する一方、別の制御システムで Phl の生産を制御することが示唆された。今後、HP72 株 Phl 生産制御システムをさらに明らかにしていくことで、植物病害抑制へ生物防除法を効果的に利用することが期待される。