

Screening of functional rhizobacteria possessing
antagonistic activities against *Fusarium oxysporum*
and phenolic acid-decarboxylation abilities

(病原性フザリウムに対する拮抗活性および

フェノールカルボン酸脱炭酸活性を指標にした機能性根圏細菌の検索)

学位論文内容の要旨

北海道大学札幌キャンパス内に自生する 37 種類の植物根から単離した 332 株の根圏細菌について、フェノールカルボン酸脱炭酸活性を指標にした機能性根圏細菌の検索を試みた。それぞれの分離細菌についてカフェ酸 [(*E*)-3,4-dihydroxycinnamic acid] を基質とした脱炭酸活性を検定し、57 株に明らかな活性を認めることができた。それらの基質誘導性ならびに基質選択性を調べ、多くの菌株がこれまで標準株として用いてきた *Klebsiella oxytoca* JCM 1665 株よりも狭い基質特異性を持つことを明らかにした。一方、上記の 332 株を含む 541 菌株を *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* を被検菌とした対峙培養試験に供し、菌糸伸長阻害活性を持つものを検索した。供試菌株のうち4株のみ(陽性菌株出現頻度 0.7%)が強い菌糸伸長阻害活性を示し、その中でもヒメジオン(キク科)から分離した *Gluconobacter* 属細菌 71F 株が最も強い活性を有していた。活性細菌株のフザリウム菌糸に対する特徴的な形態生理的效果として、菌糸側面からの過剰分岐と菌糸先端からの細胞内容物の漏出が認められた。拮抗細菌による伸長阻害を受けたフザリウム菌糸では、過剰分岐を起している細胞では核分裂自体が活性化する一方、細胞内容物が漏れだした菌糸先端部分の核に由来する蛍光は細胞内容物全体に均一に分散していくことが分かった。拮抗細菌に対峙した菌糸の先端部分は、核が崩壊することにより速やかに死滅した。活性化化合物本体の単離精製を試み、TLC 上で単独スポットを与える化合物 2 mg を得た。その化合物は分子量 138 の低分子化合物であることを突き止めた。

1) 機能性根圏細菌集団からフェノールカルボン酸脱炭酸活性を有する細菌株の検索

北海道大学札幌キャンパス内に自生する 37 種類の植物根を初夏から晩夏にかけて採取し、これらの根面から 332 株の根圏細菌を分離した。この各々の細菌株を 2 mM カフェ酸を含む 10 ml の PD 液体培地で 48 時間培養し、遠心によって培養液上清を得た。この培養液上清を 2M HCl でコンゴレッド酸性に pH 調整した後に、1.5 ml の酢酸エチルで抽出した。ボルテックスミキサーによる攪拌で得られた上層(酢酸エチル層)から 5 μ l をそのまま順相シリカゲル TLC にチャージし、CHCl₃-MeOH-HCOOH 50:5:1 で展開した。展開し終えた TLC 板は、Gibbs 試薬を噴霧し、脱炭酸生成物(3,4-dihydroxystyrene)と残存基質のスポットの消長から、それぞれの菌株のカフェ酸脱炭酸活性を検定した。標準細菌株として *Klebsiella oxytoca* JCM 1665 株を用いた。検定試験の結果、基質が残存せず、3,4-dihydroxystyrene を唯一の生成物として与える細菌を 57 株得た。次にそれらが持つカフェ酸脱炭酸酵素について基質誘導性ならびに基質選択性を調べるため、基

質を含まない PD 液体培地で 48 時間培養した菌体の培養上清を Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 7.2) に置き換え、その菌体懸濁液に 5 mM カフェ酸を添加して、25°C でさらに 12 時間振とうした。その結果、試験に供することができた 45 株のうち 19 菌株のカフェ酸脱炭酸酵素は常在型酵素で、13 株が完全に基質誘導型、残り 13 株がそれらの中間型であることが分かった。基質誘導型カフェ酸脱炭酸酵素をもつ細菌株では、カフェ酸は脱炭酸するものの、4-ヒドロキシケイヒ酸を全く受容できないタイプのものが 6 株見つかった。ケイヒ酸脱炭酸酵素保持細菌は、その基質特異性や誘導性に大きなバリエーションがあることが示された。

2) 機能性根圏細菌集団から *Fusarium oxysporum* 菌糸の生育を阻害する拮抗細菌の検索

全ての菌株について *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* を被検菌とした対峙培養試験を行い、抗フザリウム活性をもつ分離細菌株の検索を試みた。培地には PDA と MWA (Winogradsky's 無機塩溶液に 0.5% sucrose と 0.005% 酵母エキスを添加した修飾寒天培地) を用いた。MWA では気中菌糸の生成が抑制されるため、抗菌活性の定量的評価は MWA で行った。*F. oxysporum* を被検菌に用いたアッセイ系では、対峙する細菌株の抗菌活性に対する検出感度が大きく低下しており、*Aphanomyces cochlioides* (ハウレンソウ根腐れ病菌) を被検菌とした場合に比べて、活性菌株の検出率が極めて低く抑えられる。541 株の分離細菌をこの抗フザリウム試験に供した結果、ヒメジョオン(キク科)から分離された *Gluconobacter* sp. 2 株 (71D, 71F) ならびにトクサ(トクサ科)から分離された *Burkholderia* sp. 2 株 (15C, 15E) の合計 4 株にのみ強い菌糸伸長阻害活性が認められた。属が同じ陽性細菌株はそれぞれ同じ分離源から得られたため、コロニー形態に多少の差異はあるものの、15C と 15E および 71D と 71F はそれぞれ同じ種であると考えられた。検定した菌株ライブラリ全体からの陽性菌株の検出頻度は 0.7% であった。

3) *F. oxysporum* の *Gluconobacter* sp. 71F 株に対する形態生理学的応答と EtOAc 抽出画分の活性

MWA では気中菌糸の生成が抑制されるため、対峙した細菌に対するフザリウム菌糸の形態的な変化が容易に観察できる。その利点を利用し、MWA 平板上で 71F 分離株によって菌糸コロニーの生育が阻害されたフザリウム菌糸の菌糸形態の変化とそれに伴う細胞生理学的な応答について検討した。*Gluconobacter* sp. 71F 株に影響を受けた菌糸では、先端からやや距離をおいて (100 μm 以上) 菌糸側面から過剰分岐を起こし、また菌糸先端からは細胞内容物の漏出が認められた。核特異的蛍光染色試薬である Hoechst 33258 でこれらを染色すると、過剰分岐を起こしている菌糸では核数が著しく増加しており、有糸分裂自体が活性化していることが示された。一方、細胞内容物が漏れだした菌糸先端部分では、球状に膨らんだ細胞内容物全体に Hoechst 33258 特有の青白い蛍光が認められ、クロマチン断片が分散していることが分かった。従って、拮抗細菌に対峙した菌糸の先端部分は、核が崩壊することにより菌糸細胞は速やかに死滅するものと考えられた。

Gluconobacter sp. 71F 株を一面に培養した PDA 平板 (2,400 ml, 9 cm プレートで 200 枚) を凍結後に解凍し、ゲルの圧搾と水洗を繰り返してして得られた培養液 2,400 ml を等量の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル可溶性の粗抽出物 750 mg を得たが、培地 30 ml 相当量の粗抽出液は強い *F. oxysporum* 菌糸伸長阻害活性を示し、*Gluconobacter* sp. 71F 株との対峙培養時と同じ *F. oxysporum* 菌糸形態異常を引き起こした。

4) *Gluconobacter* sp. 71F 株が産生するフザリウム菌糸生育阻害活性成分の部分精製

菌糸生育阻害活性を指標に、活性成分の追跡と分画を行い、シリカゲルカラムで 30-40% MeOH/CHCl₃ 溶出画分に活性本体が認められた。TLC 分画によって単一のスポットを与える暗黄色油状化合物として 2 mg を得た。活性本体は FD-MS で親イオン m/z 138 を示し、¹H-NMR スペクトルから 1,4-二置換芳香族であることが分かった。

一連の研究の結果では、PDA 平板上で抗フザリウム活性を示した 4 株は全てカフェ酸脱炭酸活性を示さな

かったことから、脱炭酸活性を持たない細菌群と抗真菌性の因果関係を明らかにする必要がある。

以上、本研究では北大キャンパス内に自生する 37 種の自生植物の根圏から分離した 332 菌株を系統的スクリーニングにかけ、4-ヒドロキシケイヒ酸脱炭酸細菌に関する新たな知見を得ることができた。さらに、厳しい条件に設定した抗フザリウム試験で 541 菌株から 4 株の活性細菌を見だし、16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性検索から 2 株が *Gluconobacter* sp.、残り 2 株が *Burkholderia* sp.であることを明らかにした。最も活性の強かった *Gluconobacter* sp. 71F 株についてフザリウム菌糸に対する形態生理学的影響を解析し、その活性本体を単離することができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 床 泰 之
副 査 教 授 鍋 田 憲 助
副 査 教 授 生 方 信
副 査 講 師 福 士 幸 治

学位論文題名

Screening of functional rhizobacteria possessing antagonistic activities against *Fusarium oxysporum* and phenolic acid-decarboxylation abilities

(病原性フザリウムに対する拮抗活性および

フェノールカルボン酸脱炭酸活性を指標にした機能性根圏細菌の検索)

本論文は、英文 111 頁、図 41、表 14、4 章からなり、参考論文 2 編が付されている。

植物の根に付着する根面細菌は、それらの根への定着性から、宿主植物に罹患する土壌伝播性病原菌に対する生物農薬資材として有望視されている。実際、*in vitro* 試験において活性を示すものが多く見つかっているが、それらが *in vivo* で高い効果を示した例はほとんど無く、特にフザリウム感染の防除資材として実用化されたものは皆無に等しい。以上の事情から、微生物農薬によるフザリウム感染病抑制は困難なのではないかとの疑問が呈されるとともに、これまでの資材候補を見いだす検索方法に大きな問題があるのではないかとの指摘もある。本研究では、北海道大学キャンパス 10 箇所から採取した自生植物の根面から根面細菌を 541 菌株分離し、比較的拮抗細菌が見つかりにくいとされている *Fusarium oxysporum* 菌糸との対峙培養を行い、4 株の拮抗細菌を検索・単離・同定している。また、分離菌株ライブラリ中から無作為に選んだ 332 菌株について、カフェ酸 (3,4-ジヒドロキシケイヒ酸) 脱炭酸活性の有無について調べ、微生物生態学的な知見を得ている。

1. 機能性根圏細菌集団からフェノールカルボン酸脱炭酸活性を有する細菌株の検索

20 科 37 種の植物根圏から得た 332 細菌株について、カフェ酸を基質とした 4-ヒドロキシケイヒ酸脱炭酸活性検定試験を行った。脱炭酸活性 (PAD 活性) を示す標準細菌株には *Klebsiella oxytoca* JCM 1665 株を用いた。その結果、基質が残存せず、3,4-dihydroxystyrene を唯一の生成物として与える PAD 活性陽性細菌を 59 株得た。さらに、それらのカフェ酸脱炭酸活性について基質誘導性ならびに基質選択性を調べた。その結果、試験に供することができた 45 株のうち 19 菌株のカフェ酸脱炭酸酵素が常在型酵素で、13 株が完全に基質誘導型、残り 13 株が基質によって活性が著しく上昇する中間型であることを明らかにしている。更にカフェ酸脱炭酸酵素をもつ細菌株のグループから、カフェ酸は脱炭酸するもの

の、4-ヒドロキシケイヒ酸を基質として全く受容できないタイプのものを6株見つけた。以上の結果から、ケイヒ酸脱炭酸酵素保持細菌群には、基質特異性や誘導性に比較的幅があることを示した。

2. 機能性根圏細菌集団から *Fusarium oxysporum* 菌糸の生育を阻害する拮抗細菌の検索

541株の分離細菌を寒天平板培地による抗フザリウム試験に供し、ヒメジョオン(キク科)から分離された *Gluconobacter* sp. 2株(71D, 71F)ならびにトクサ(トクサ科)から分離した *Burkholderia* sp. 2株(15C, 15E)の合計4株を抗フザリウム活性細菌株として得た。属が同じ細菌株はそれぞれ同じ分離源から得られたため、コロニー形態に多少の差異はあるものの、15Cと15Eおよび71Dと71Fはそれぞれ同じ種であると考えられるが、4菌株を別菌株と見なしても、検定した菌株ライブラリ全体からのアッセイ陽性菌株の検出頻度は0.7%と極めて低いことを示した。

3. *F. oxysporum* の *Gluconobacter* sp. 71F 株に対する形態生理学的応答と EtOAc 抽出画分の活性

MWAでは気中菌糸の生成が抑制されるため、対峙した細菌に対するフザリウム菌糸の形態的な変化が容易に観察できることを示した。これを利用し、MWA平板上で71F分離株によって菌糸コロニーの生育が阻害されたフザリウム菌糸の菌糸形態の変化とそれに伴う細胞生理学的な応答を調べた。*Gluconobacter* sp. 71F株に影響を受けた菌糸では、先端からやや距離をおいて(数100 μ m以上)菌糸側面から過剰分岐を起こし、また菌糸先端からは細胞内容物の漏出を認めた。核特異的蛍光染色試薬であるHoechst 33258でこれらを染色すると、過剰分岐を起こしている菌糸では核数が著しく増加することを明らかにした。一方、細胞内容物が漏れだした菌糸先端部分ではクロマチン断片が分散していることを確認し、拮抗細菌に対峙した菌糸の死滅には核の崩壊が伴うことを明らかにした。

4. *Gluconobacter* sp. 71F 株が産生するフザリウム菌糸生育阻害活性成分の部分精製

Gluconobacter sp. 71F株を一面に培養したPDA平板(2,400ml、9cmプレートで200枚)を凍結後に解凍し、ゲルの圧搾と水洗を繰り返して得られた培養液2,400mlを等量の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル可溶性の粗抽出物750mgを得たが、培地30ml相当量の粗抽出液は強い *F. oxysporum* 菌糸伸長阻害活性を示し、*Gluconobacter* sp. 71F株との対峙培養時と同じ *F. oxysporum* 菌糸形態異常を引き起こした。

これらの研究結果のうち、フザリウムに対する拮抗細菌の検索とこれに対峙した菌糸についての細胞生理学的な検討内容は、2006年のIUPAC国際農薬化学会議 in KobeでSelected Oral Presentationに選ばれ、また、それらの内容をまとめたオリジナル論文一報が日本農薬化学学会英文誌である *Journal of Pesticide Science*(I.P. 0.55)に受理され、現在印刷中である。また、フェノールカルボン酸脱炭酸活性を有する細菌株検索の研究成果は、農学部紀要英文誌 *Journal of Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University*に受理されている。

よって、審査員一同は、Albert Asante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。