



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on screening of paddy-rhizospherous microbes against rice seedling blight disease and characterization of their physiological traits [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	王, 蒙岑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11106号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53778
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mengcen_Wang_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(農学)

氏 名 Mengcen Wang

審査担当者	主査	教授	橋床泰之
	副査	教授	浅野行藏
	副査	准教授	橋本 誠
	副査	講師	崎浜靖子

学位論文題名

Studies on screening of paddy-rhizospherous microbes against rice seedling blight disease and characterization of their physiological traits

(イネ苗立枯細菌病に拮抗性を示すイネ根圏微生物のスクリーニングと
その生理学的特性の解明に関する研究)

本論文は本文125ページ、図64、表3、スキーム4、4章からなり、155本の文献を引用し、参考文献2本が付されている。内容は以下のとおりである。

Burkholderia plantarii はイネ苗立枯細菌病を引き起こす植物病原性細菌で、ファイトキシンとして、3 価鉄と強くキレートするトロポロンが知られている。またこの細菌による感染は種子伝播性であることから、化学薬剤防除が困難とされ、十分な防除技術は見出されていない。この病原細菌に拮抗する微生物を生物農薬資材候補として検索する目的で、186 株の微生物(真菌および細菌)を刈り取り後の北海道地方のイネ根圏土壌から分離し、トロポロンと同じ鉄キレート能が高く、安価に入手できるカテコールを用いてカテコール耐性微生物を選抜した。この結果、10 mM カテコール添加 PD 培地で生育できる 16 株の微生物を分離した。これら選抜株を、イネ苗立枯細菌病に対する微生物農薬資材探索のためのバイオアッセイに供した。本博士論文研究では、2 つの分離株、真菌 *Trichoderma virens* PS1-7 株と真正細菌 *Burkholderia heleaia* PAK1-2 株について、それぞれの代謝および形態学的な性状を調べている。

1. 鉄キレート物質応答因子として *Trichoderma virens* PS1-7 が産生するオートレギュレーションシグナル分子による分生子形成誘導

上記 16 株のうち、20 mM カテコール含有培地で唯一生き残り、カテコール耐性が最も高い *T. virens* PS1-7 は、0.1-1.0 mM のカテコールに晒されるとストレス誘導性セスキテルペンジオール carot-4-en-9,10-diol (caf-603) を産生することを見出した。*T. virens* PS1-7 は、これが *B. plantarii* のファイトキシンであるトロポロンに低濃度(0.05-0.2 mM)で晒された場合にも、化学ストレス応答的に carot-4-en-9,10-diol を生成した。培地中のカテコールあるいはトロポロン濃度の上昇に比例して、化学ストレス応答性セスキテルペンジオール carot-4-en-9,10-diol を菌体外に放出し、これが *T. virens* PS1-7 分生子形成を促進することを明らかにした。その産生量は、10 日間培養で最大 47 μ M になった。化学ストレスによって培地へ放出・蓄積される量と同量の carot-4-en-9,10-diol を外部から与えると、その培地の栄養条件に関わらず *T. virens* PS1-7 は応答し、分生子を形成した。分生子形成の誘導に必要な carot-4-en-9,10-diol の化合物濃度は 20 μ M というわずかな量であることから、こ

れが *T. virens* PS1-7 株の自己制御因子として十分に機能していることが示唆された。

2. トロポロン産生抑制因子としての carot-4-en-9,10-diol の再同定と *B. plantarii* への擬似バイオフィルム誘導

B. plantarii との共培養によって、*T. virens* PS1-7は*B. plantarii* に対するトロポロン産生抑制効果を示したため、トロポロン結晶析出の抑制を指標とした試験法によって、*T. virens* PS1-7 が産生するトロポロン生成抑制活性因子の追跡を行った。その結果、活性成分として carot-4-en-9,10-diol を再同定した。この化合物は 10 から 200 μ Mの範囲で *B. plantarii*に対して十分な抑制効果を示し、イネ苗立枯細菌病を接種したイネ芽生えの病徴発現を強く抑制した。qRT-PCR 解析によって、carot-4-en-9,10-diol の作用機作は、*B. plantarii* 菌体におけるAHL synthase 遺伝子*plal* の転写抑制であることを示した。一方、トロポロン自体が*B. plantarii* のバイオフィルム形成を担うオートインディューサーであることを見出した。LIVE/DEAD Bacterial Cell Viability Assay Kitを用いた試験により、トロポロンで誘導されたバイオフィルムは生きた細胞として長期間保持されるが、carot-4-en-9,10-diol で誘導された擬似バイオフィルムでは定常期に至った細胞はそのほとんどが死滅したことが示された。従って、*T. virens* PS1-7 が産生する carot-4-en-9,10-diol はquorum sensing inhibitor であることが強く示唆された。

3. *Burkholderia heleaia* PAK1-2 株が産生するインドール酢酸による *B. plantarii*トロポロン生合成阻害

*Burkholderia heleaia*と同定されたカテコール耐性細菌 PAK1-2 は、イネ芽生えを使ったバイオアッセイ系で *B. plantarii*に対する拮抗性ばかりでなく、イネに対する生育促進効果も示した。*B. heleaia* PAK1-2 が低アミノ酸培地で非誘導的に産生する化合物として、インドール酢酸を同定し、この化合物が *B. plantarii* のトロポロン産生を強く抑制することが分かった。またこの研究の過程で、トロポロンがフェニルアラニンを前駆体、フェニル酢酸を生成中間体として生合成されることを見出し、これを重水素ラベル化合物による代謝実験で証明した。アミノ酸残基の芳香環上の 5 個のプロトン(H) が全てジューテリウム (D) に置き換わった L-フェニルアラニン- d_5 は、極めて効率よくフェニル酢酸- d_5 とトロポロン- d_5 に変換された。このインドール酢酸は、トロポロン生合成中間体であるフェニル酢酸に構造が類似しているため、そのアンタゴニストとして生合成系内のフェニル酢酸変換酵素を阻害し、その結果トロポロンが蓄積されない可能性を指摘した。

以上、本研究ではカテコール耐性を初期スクリーニングの指標として分離した *T. virens* PS1-7 株と *B. heleaia* PAK1-2 株の *B. plantarii* に対する拮抗性と、これらが産生する *B. plantarii* トロポロン産生抑制因子の追跡を行い、carot-4-en-9,10-diol および indole-3-acetic acid をそれぞれ同定した。また、それら化合物の生物間シグナル物質としての極めて興味深い生理活性および機能性を明らかにした。これらの成果は、生物合理的なスクリーニングによる効率的な微生物農薬資材探索と、二次代謝産物によるバイオフィルム形成を含む病原菌機能分化制御技術の進展に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、ワン メンツェンが博士(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。