

研究トピックス

キュウリ苗立枯病を抑える遺伝子組換え微生物の土壌微生物相への影響

企画戦略室 藤井 毅 田村 季実子* 大野 雅弘** 長谷部 亮***

(現：*生物生態機能研究領域、**日産化学、***農林水産技術会議事務局)

はじめに

作物病原菌の生育を抑止する微生物は、作物病害の生物的防除（バイオコントロール）に利用されています。バイオコントロールの適用を広げるためには、微生物がもつ病原菌生育抑止能を人為的に高めることが求められますが、その目的のために、遺伝子組換え技術が有力な武器になると期待されています。

しかし、バイオコントロール用の遺伝子組換え微生物に限らず、日本で組換え微生物が野外利用された例はありません。組換え微生物を野外環境下で利用するためには、その有用性を高める一方で人や動植物への安全性の確認はもちろん、生物多様性など環境への影響の評価手法を確立して、生態系に対する安全性を確認する必要があります。

本研究では、キュウリ生育初期の根圏土壌（根の周りの土）で定着性が高い細菌に、作物病原系状菌の細胞壁を分解する酵素（キチナーゼ）の遺伝子を導入した「組換え根圏細菌」を作出し、キュウリ苗立枯病に対する防除効果を確認しました。さらに、土壌から直接抽出した、いわゆる環境DNA（eDNA）を解析することにより、この組換え根圏細菌の接種が土壌微生物の多様性に及ぼす影響を調べました。

キュウリ苗立ち枯れ病を抑制する遺伝子組換え根圏細菌の作出

キュウリ苗立ち枯れ病を抑制するために、作物病原系状菌の細胞壁を分解する酵素（キチナーゼ）を土壌細菌 *Pseudomonas putida* に導入しました。すなわち、海洋細菌由来のキチナーゼ遺伝子に、遺伝子発現を高いレベルで引き起こす活性をもつプロモーター配列を連結し、抗生物質カナマイシン（Km）に対する耐性遺伝子をマーカー遺伝子とする広宿主域ベクターに組み込んだキチナーゼ遺伝子発現ベクター pKAC907 を構築しました。次に、キュウリ根圏から根圏定着性の高い *P. putida* B101 株を選抜し、この菌株に pKAC907 を電気穿孔法を用いて導入しました。得られたキチナーゼ遺伝子発現ベクターを有する組換え根圏細菌、*P. putida* B1017 株は、培地中で高いキチナーゼ生産能を示しました。また、寒天培地上にキュウリ苗立枯病の病原系状菌 *Rhizoctonia solani* とともに対峙培養して *R. solani* の菌糸成長阻害能を比較したところ、キチナーゼ遺伝子ベクターを導入した B1017 株では、分泌するキチナーゼの影響で病原菌 *R. solani* の生育を阻害する能力が高まりました（図1）。*P. putida* B1017 株は、植継ぎを三回繰り返した後でも98%の細菌がキチ

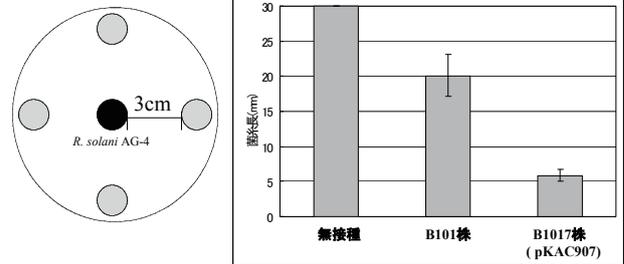


図1 組換え根圏細菌の病原系状菌菌糸生長阻害能

ナーゼ遺伝子発現ベクターを保持しており、このキチナーゼ遺伝子発現は比較的安定して保持されることも確認されました。

組換え根圏細菌による土壌病害の抑制

病害を抑制する組換え細菌の土壌中での挙動を調べるためには、この菌と他の土壌細菌を区別する必要があります。そこで、根圏分離株 B101 株に株抗生物質リファンピシン（Rif）耐性をもたせ、pKAC907 を導入した Rif-Km 耐性を持ち、かつキチナーゼ生産能を有する組換え根圏細菌 *P. putida* B1017R 株を作出しました。B1017R 株を用いて、組換え微生物のキュウリ苗への接種法や発病抑制条件を閉鎖系温室で検討したところ、*P. putida* B1017R 株は、高濃度の菌液（ 3×10^8 cfu/ml）に催芽した種子を1時間浸漬するだけでキュウリ苗立枯病に対する防除効果を得ることができました（図2－実験1）。また、病原菌で汚染されている土壌へキュウリを移植する時に組換え細菌を接種しても発病を抑えられることが明らかになりました（図2－実験2）。作出した組換え根圏細菌の土壌及び根圏での生残性を検討したところ、キュウリ根圏から選抜した根圏への定着性が高い株を宿主とした組換え根圏細菌 *P. putida* B1017R 株は、実験室継代培養株を宿主にした場合に比較して土壌中で高い生残性を示しました。また、組換え微生物の培養液に浸漬したキュウリ種子を播種した場合、根圏に接種した組換え根圏細菌は、1週間後でも接種時の10%程度の組換え微生物が生残していました。

組換え根圏細菌の接種は土壌の微生物相に影響を及ぼすか？

組換え根圏細菌を接種すると、土壌に本来生息している微生物相に何らかの影響を及ぼす可能性があります。そこで、組換え根圏細菌 B1017R 株の培養液に浸漬したキュウリ種子を農業環境技術研究所の果樹園土壌に播種し、経時的に根圏の全糸状菌数及び全細菌数を培養法で

測定しました。また、培養法で検出できない微生物を調べるために、土壌から直接DNAを抽出し、そのDNAからPCR法で糸状菌及び細菌のリボソームDNAを特異的に増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法で糸状菌相及び細菌相を、非組換え株 (B101R) を接種した区と比較しました。その結果、培養法による総細菌数及び総糸状菌数ともに、組換え体接種及び非接種区の間で差は認められませんでした。また、土壌から直接抽出したDNAを鋳型にし細菌16S rDNA及び糸状菌18S rDNAを標的としたPCR-DGGE 解析によっても、細菌相及び糸状菌相ともに組換え根圏細菌接種区と非接種区の間で顕著な差は見出されませんでした (図3)。

このように、病原糸状菌の細胞壁を分解する酵素キチナーゼを高発現するように改良した組換え根圏微生物は、

キュウリ根圏に定着して、キュウリ苗立枯病の発病を抑制しました。また、この組換え根圏細菌を土壌に添加した場合、土壌に生息する微生物、特に細胞壁にキチン質を有する糸状菌類に影響を及ぼすことが予想されましたが、実際には組み換え根圏細菌の接種は土壌糸状菌叢に顕著な影響を及ぼさないことが明らかになりました。

今回開発した組換え微生物は、すぐに実用化できるものではありません。実用化のためには、さらに環境への影響を生じないような工夫が必要です。プラスミドに存在する組換え遺伝子を染色体に移し換え安定化させると同時に、薬剤耐性遺伝子を除去する必要があります。さらに、出来うれば組換え微生物が、その役割を果たした後は自動的に死滅するようなスイサイド (自殺) システムを導入するなど、更なる改良を加えることが考えられます。

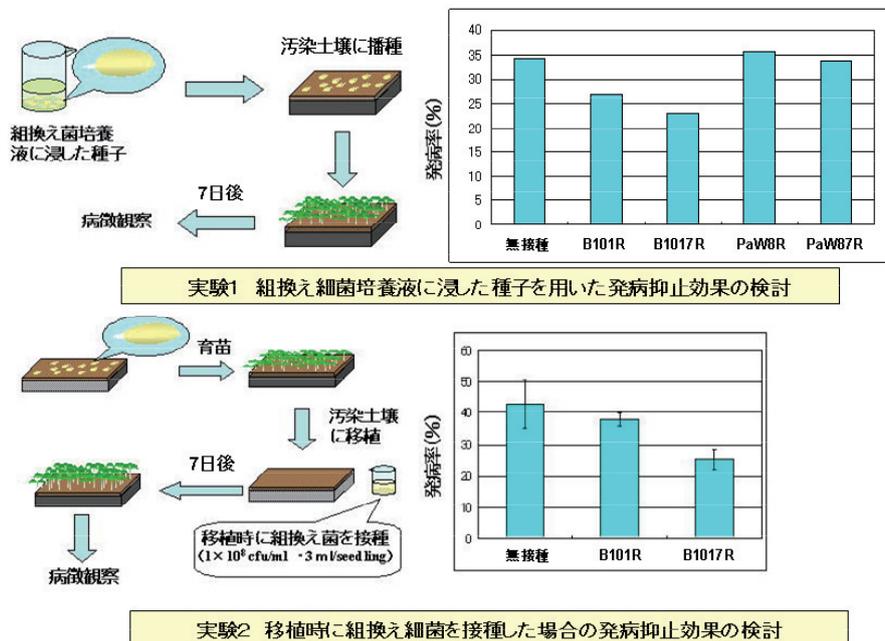


図2 組換え根圏細菌のキュウリ苗立枯病抑制効果の検討

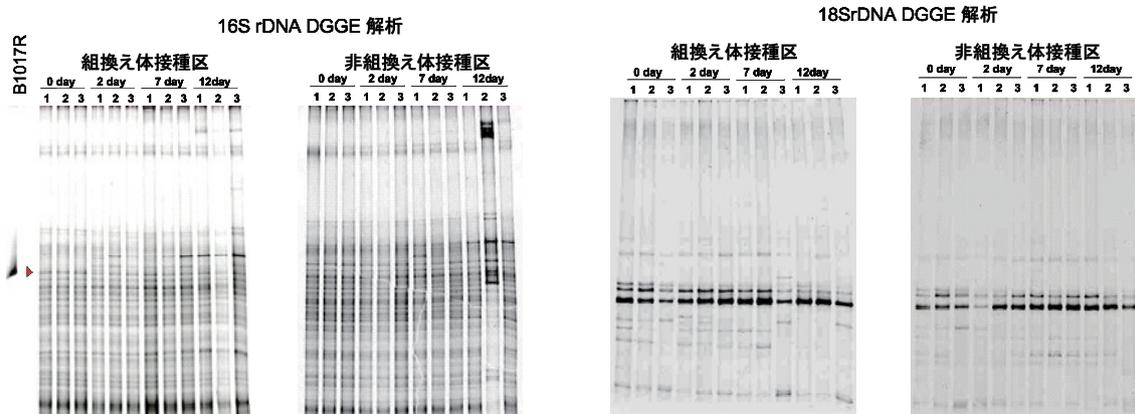


図3 PCR-DGGE法による組換え微生物を接種したキュウリ根圏の細菌相 (左: 16S-rDNA DGGE) 及び糸状菌相 (右: 18S-rDNA DGGE) の解析