

枯草菌による生物防除のメカニズム

東京工業大学資源化学研究所 しょう 正 だ 田 まこと 誠

I 緒 言

土壌病害の防止や抑制のために拮抗菌を用いた生物防除は、環境にやさしい方法として、古くから種々の試みがなされてきた。拮抗菌として分離された数もかなりの数になるが、日本においては *Pseudomonas* や *Trichoderma* を用いた成功例が報告されている。生物防除は、植物の種類、栽培方法、気候、土壌の種類など地域固有の因子が強く、一般性に乏しく、期待された程普及していない嫌いがあるが、その原因の一つに防除メカニズムの解明が不十分なことが挙げられる。

本稿では、我々がコンポストから分離した枯草菌による生物防除について紹介する。枯草菌を用いた生物防除に関しては浸根接種、種子コーティング、土壌灌注などの方法が海外で報告されている。しかしこれらの報告でもその抑制メカニズムは未解決である。ここで紹介する枯草菌の生物防除に関しては、この菌の生産する抗菌性物質の構造の決定、抗菌物質の合成に関与する遺伝子のクローニング、土壌及び植物体を用いた実験を通して、防除メカニズムの解明が他の菌と比べると進んでいる点の特徴である。

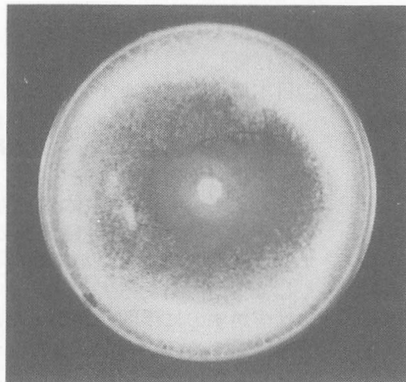
II 枯草菌による植物病原菌抑制 (in vitro 実験)

我々が分離した枯草菌の一種 *Bacillus su-*

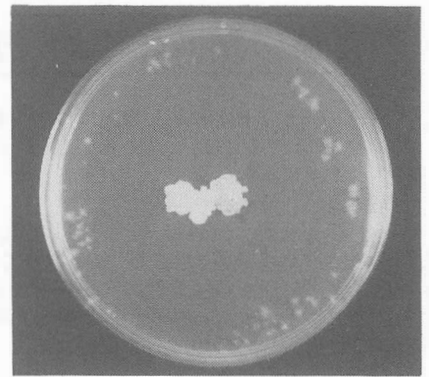
btilis NB 22 がプレート上で植物病原菌に対する増殖抑制効果を示している様子を図-1 に示す。この菌そのもの及び培養した培養液から菌を除去した上清液による各種の病原菌に対する抑制試験をした結果を表-1 に示す。この結果から NB 22 の抗菌スペクトルがかなり広いことがわかる。特徴的なことは NB 22 が病原性糸状菌ばかりでなく病原性細菌に対しても抗菌性を示すことである。

III *B. subtilis* NB 22 及び培養液を用いた植物試験

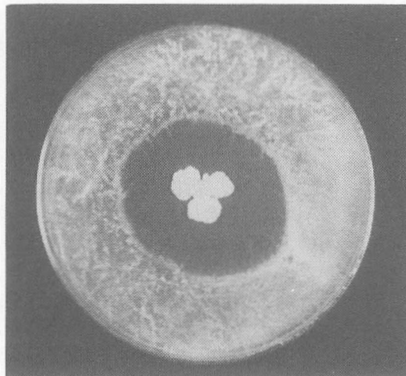
神奈川県農地において実際に発病が問題となってい



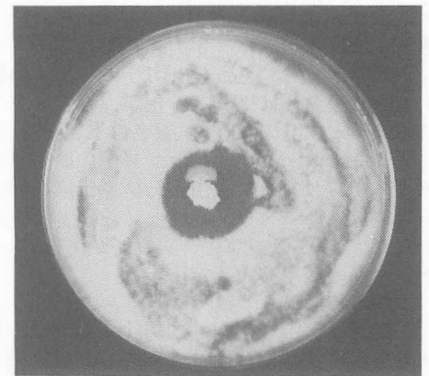
Fusarium oxysporum



Pyricularia oryzae



Rhizoctonia solani



Verticillium dahliae

図-1 枯草菌 *B. subtilis* NB22 による各種の植物病原菌の抑制結果 (in vitro 実験)

表-1 *B. subtilis* NB22 の菌体及び除菌培養液による各種の植物病原菌に対する抑制効果 (*in vitro* 実験による阻止円の直径で示す)

植物病原菌		NB22 の菌体による 阻止円の直径 (mm)	除菌液による阻止円 の直径 (mm)
糸状菌			
<i>Alternaria mali</i> IFO 8984	(りんご斑点落葉病菌)	21	33
<i>Cercospora kikuchii</i> NIAES 5039	(ダイズ紫斑病菌)	28	40
<i>Phytophthora infestans</i> IFO 5547	(トマト疫病菌)	25	30
<i>Phytophthora capsici</i> 09001	(カボチャ疫病菌)	23	n.d.
<i>Botrytis cinerea</i> Bot 1	(キュウリ灰色カビ病)	40	34
<i>Rhizoctonia solani</i> NIAES 5219	(イネ紋枯病菌)	40	38
<i>Rhizoctonia solani</i> K-1	(ケイトウ立枯病菌)	23	n.d.
<i>Rhizoctonia solani</i> MAFF 03-05223	(芝の病原菌)	38	20
<i>Pyricularia oryzae</i> NIAES 5001	(イネいもち病菌)	40	35
<i>Cochliobolus miyabeanus</i> NIAES 5425	(イネごま葉枯病菌)	32	33
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> NIAES 5117	(キュウリつる割病菌)	10	n.d.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> race J1 SUF 119	(トマト萎ちょう病菌)	21	18
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i> KEF2R-1	(トマト根腐れ萎ちょう病菌)	21	20
<i>Fusarium moniliforme</i> H-110	(イネばか苗病菌)	21	n.d.
<i>Fusarium roseum</i> f.sp. <i>cerealis</i> 030201	(トウモロコシ立枯病菌)	16	n.d.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i> 02010402	(イチゴ萎黄病菌)	16	n.d.
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>spinaciae</i> 0201501	(ホウレンソウ萎ちょう病菌)	15	n.d.
<i>Pythium ultimum</i> Trow H-1	(野菜苗立枯病菌)	25	25
<i>Verticillium dahliae</i> Klebahn V-3	(トマト半身萎ちょう病菌)	18	n.d.
<i>Gibberella zeae</i> 030101	(小麦赤カビ病菌)	29	n.d.
細菌			
<i>Xanthomonas oryzae</i> IFO 3998	(イネ白葉枯病菌)	35	25
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> QN 8206	(カンキツかいよう病菌)	29	n.d.
<i>Pseudomonas caryophylli</i> A	(カーネーション萎ちょう細菌病菌)	14	n.d.
<i>Pseudomonas solanacearum</i> TOM-w	(トマト青枯病菌)	23	18
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> P1-7415	(キュウリ斑点細菌病菌)	25	25
<i>Pseudomonas glumae</i> Ku 8106	(イネもみ枯細菌病菌)	13	n.d.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ku 7501	(根頭がんしゅ病菌)	14	n.d.
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> B9	(ブロッコリー軟腐病菌)	14	n.d.

n.d.: 測定せず。

るトマトの *Fusarium oxysporum* による根腐れ萎ちょう病及び *Pseudomonas solanacearum* による青枯病について NB 22 の抑制作用の有無を温室において検討した。

1 トマト根腐れ萎ちょう病の抑制テスト

根腐れ萎ちょう病は糸状菌 (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) により引き起こされ、特に冬季に発病するため大きい損害をもたらしている。枯草菌 NB 22 による拮抗効果の可能性を、この枯草菌の耐熱性という特徴を生かし、土壌を蒸気消毒し、本菌を土壌中に優占的に生存させる試みも行った。また有機資材との混合による枯草菌の活性化の可能性についても検討した。方法の詳細は参考文献 4) に記載してある。その結果、蒸気殺菌と NB 22 と稲わらとの混合投入とが最大の収量を得る方法であった。図-2 に 60 日目のトマトの根の状態を示す。NB 22 を添加すると根腐れ状態が抑制されていることは明らかである。

2 トマト青枯病の抑制テスト

表-1 から明らかなように NB 22 は糸状菌ばかりでなく病原性の細菌にも抑制作用を示すことが特徴である。そこでトマトの細菌病の代表である青枯病菌 (*P. solanacearum*) による青枯病の防除の実験を行った。詳細は文献 4) を参照していただきたい。結果を図-3 に示す。対照は菌ならびに培養液ともに処理しなかった場合で、定植後 12 日で 90% のトマトの株が枯死した。菌体を含む培養液を施用した場合、定植後 24 日まで 10% しか枯死しなかった。菌体の懸濁液を加えると 10 日で 20%, 24 日で 50% と中間的な値が得られた。この結果から培養液の処理が効果的と思われる。後述するように、本菌の病害抑制作用に、本菌が菌体外に生産する抗菌物質が関与することが解っている。したがって、本実験で、NB 22 菌の菌体のみを土壌施用しても、病害抑制がみられたことは、枯草菌が土壌中で抗菌物質を生産して

いることを示唆するものである。

IV 抗菌性物質について

表-1 から除菌培養液そのものも抗菌性を示すことから、NB 22 は菌体外に抗菌性物質を生産していることがわかり、その物質の構造決定を行った。

方法の詳細は省略するが詳しい内容は参考文献3)に記載されている。ここでは結果のみをのべる。種々の分析と解析の結果、抑制物質は環状ペプチド抗生物質イチュリン (iturin A) であると同定された。この iturin A の構造を図-4 に示す。この物質は Asn, Gln, Pro, Ser, Tyr の α -アミノ酸を含み、これらのモル比は 3:1:1:1:1 である。また 1 モルの β -アミノ酸を含み環状構造を取り、この β -アミノ酸に種々の側鎖が結合している。



図-2 *B. subtilis* NB22 によるトマト根腐萎ちょう病の防除結果を示すトマトの根部

A: 対照

B: 蒸気殺菌した土壌に稲ワラと NB22 を施用

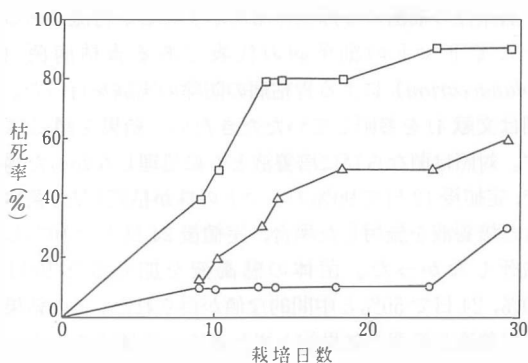
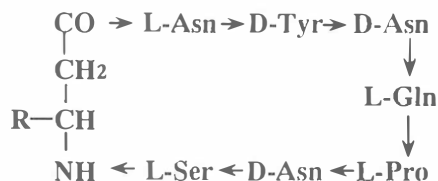


図-3 *B. subtilis* NB22 によるトマトの青枯病の防除における枯死率の変化

□: 対照, △: 菌体の懸濁液を使用, ○: 培養液を使用

る。側鎖は図-5 の R に示す。これらの物質の定性分析および定量分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で可能でありそのパターンを図-5 に示す。HPLC パターン上の Peak 1 から Peak 6 はそれぞれ上述の β -アミノ酸に対応する。ただし Peak 6 は量的にも少なく以後の研究では詳しく検討を行っていない。

A



B

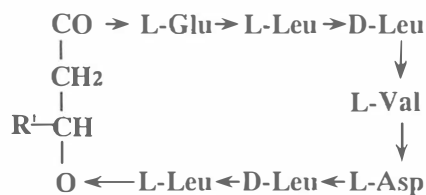
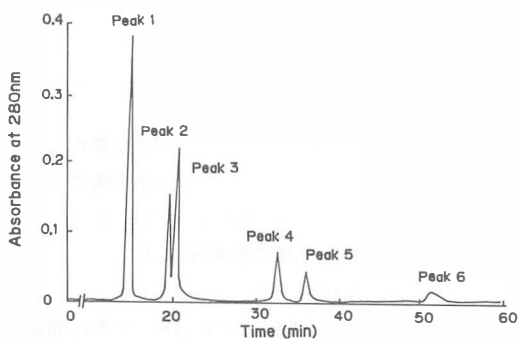


図-4 iturin A (A) と surfactin (B) の構造

R: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}-$, $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_2)_8-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_9-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-$, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{10}-$.

R': $(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_9-$.



	R	β -amino acid group
Peak1	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	$n\text{-C}_{14}\text{-}\beta\text{-amino acid}$
Peak2	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-$ CH_3	$anteiso\text{-C}_{15}\text{-}\beta\text{-amino acid}$
Peak3	$\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-$ CH_3	$iso\text{-C}_{15}\text{-}\beta\text{-amino acid}$
Peak4	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	$n\text{-C}_{16}\text{-}\beta\text{-amino acid}$
Peak5	$\text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ CH_3	$iso\text{-C}_{16}\text{-}\beta\text{-amino acid}$
Peak6	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	$n\text{-C}_{17}\text{-}\beta\text{-amino acid}$

図-5 HPLC によるピークパターン及び iturin A の構造 (R は図-4 に対応する)

V 抑制物質 iturin の各成分の最少阻止濃度 (MIC)

NB 22 は図-5 に示す各ピークの混合物を生産するが、各 iturin A 成分が各種の微生物に対してどのレベルの MIC [最少阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration)] を示すかを検討すると、成分それぞれの活性の比較が可能となる。そこで図-5 で単離した抑制物質の各成分 (peak 1~5) の MIC を 7 種類の糸状菌、2 種類の酵母、4 種類の細菌について決定した。

表-2 に示すように *P. oryzae*、*C. miyabeanus* といった稲の病原菌に対する効果が低濃度で有効なことが明らかになった。また iturin A の側鎖の長さが長いほど低濃度で抑制することが明らかになった。植物病原菌以外の菌に対する MIC が大きいことはこの物質が植物病原菌に特に効果を示す可能性があり、この菌を土壤中に施用しても生態系に悪影響をおよぼす可能性が小さいとも考えられる。

VI iturin A の糸状菌に対する作用

図-6 はシャーレの上に増殖させた *F. oxysporum* の菌糸に対して iturin A を作用させたときの様子の写真である。菌糸の変形、膨潤および破裂している様子が見られる。この物質がこの様な効果を示す作用メカニズムのひとつとして、生体膜における作用が考えられる。水に対する溶解度が小さい iturin A は脂質には良く溶けることから、病原菌の脂質層に溶解し陽イオンとの複合体をつくり、イオンの透過性を高める作用があると予想し

た。そこで平面リン脂質の二重膜を用いた実験により、この物質のイオン透過性を調べた。使用した脂質はアゾレクチンでこれはホスファチジルコリンと主成分とした脂質で、この脂質の人工膜を作り、膜の片側に iturin A をいれ、両側に電圧を印加するとイオン透過に伴い特異的な電流変化がみられる。各種のイオンの透過性を検討した結果、K イオンを選択的に透過することがわかった。これはあくまでも人工膜の結果ではあるが、図-6 の現象から判断すると、iturin A は糸状菌の膜に結合すると、イオンチャンネルと形成し、K イオンを膜内から外に輸送し、その結果逆方向に水が流入し、最終的に細胞膜が膨潤し破裂を引き起こすと考えられる。

VII 枯草菌の生産する抗菌物質 iturin A と surfactin について

枯草菌 *B. subtilis* NB 22 は抗菌物質 iturin A を生産し、その抗菌性により種々の植物病原菌を抑制するものと考えられた。類似の菌 *B. subtilis* RB 14 も抗菌性を示す菌であるが、この菌を調べると iturin A 以外にサーファクチン (surfactin) も生産することがわかった。surfactin の構造を図-4 に示す。この物質も 7 種類の α -アミノ酸からなり環状構造をとることは iturin A と同じであるが、構成アミノ酸の種類は両物質で異なり、か

表-2 Iturin A の各成分が各種の微生物に対して示す最少阻止濃度 (MIC)

微生物	最少阻止濃度 (MIC) (mg/l)				
	Peak 1*	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
<i>Cercospora kikuchii</i>	25	25	12.5	6.25	6.25
<i>Verticillium dahliae</i>	50	25	12.5	6.25	6.25
<i>Fusarium oxysporum</i>	50	25	25	25	12.5
f.sp. <i>lycopersici</i>					
<i>Alternaria mali</i>	50	25	25	12.5	12.5
<i>Rhizoctonia solani</i>	12.5	12.5	6.25	6.25	6.25
<i>Pyricularia oryzae</i>	12.5	6.25	6.25	3.13	3.13
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	50	12.5	12.5	6.25	3.13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	25	25	12.5	6.25
<i>Candida tropicalis</i>	50	25	25	12.5	12.5
<i>Xanthomonas oryzae</i>	12.5	6.25	6.25	3.13	3.13
<i>Pseudomonas lachrymans</i>	12.5	6.25	6.25	3.13	3.13
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	>100	>100	>100	>100

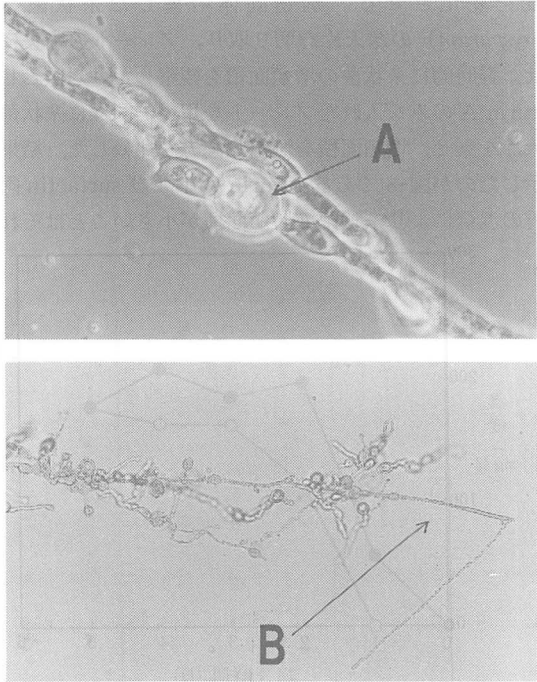


図-6 Iturin A が病原菌 *Fusarium oxysporum* に作用したときの病原菌の形態変化。A：膨潤した菌糸、B：破裂した菌糸

*Peak 1~5 は図-5 を参照のこと。

つ iturin A の β -アミノ酸結合部分が surfactin では β -ヒドロキシカルボン酸のエステル結合になっている。surfactin も抗菌性はあるものの iturin A と比較すると非常に弱く、むしろバイオサーファクタントとしての作用は生物由来の物質の中で最も大きい。例えば 500 mg/l の surfactin を水にいれると、表面張力が 75 mN/m から 25 mN/m に低下する。表面張力を 30 mN/m 以下に低下させるバイオサーファクタントはあまり存在しないことから、surfactin の界面活性性能の大きさがわかる。

また枯草菌 RB 14 株を液体培養 (Polypepton 3%, グルコース 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% を含む培地を使用) すると図-7 のようなパターンで iturin A と surfactin とが生産される。surfactin の生産は初日から見られ、2 日でピークに達する。iturin A は surfactin より遅れて生産が始まり、5 日まで増加しつづけることがわかる。

これらの 2 種類の物質を枯草菌が生産することと植物病原菌抑制作用との関係も病害抑制メカニズムを考える上で重要である。まず、両物質を生産することにより抗菌作用の相乗効果が見られるのではないかと考え、以下の実験を行った。PDA 培地 (ポテト-デキストロース-寒天培地) のプレートに iturin A と surfactin を混合する。このとき surfactin は 50 mg/l と固定し iturin A 濃度を変化させる。別途固体培養した糸状菌 (*F. oxysporum*) の寒天片を切り取り、プレートの中央に乗せ、経時的に糸状菌の増殖面積を観察した。対照として iturin A のみを入れたプレートを用い、同様に糸状菌寒天片を乗せ、増殖面積を測定し両方を比較した。結果を示したのが図-8 である。iturin A および surfactin 両物質の混合により糸状菌の増殖面積が小さいことはそれだ

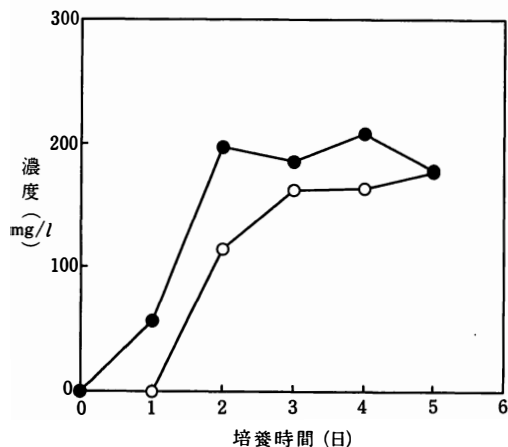


図-7 *B. subtilis* RB14 の iturin A 及び surfactin 生産の経時変化
—○— iturin A, —●— surfactin

け増殖が抑制されていることを意味し、両物質の相乗効果と判断できよう。

土壤中でもこうした相乗効果が起こっているのではないかと想像している。先にも述べたように、surfactin そのものの抗菌活性が高くないことから判断すると、まず surfactin が合成され、これが植物病原菌の細胞膜に攻撃を加え、細胞膜にダメージを与えて、次に遅れて合成される iturin A が抗菌物質として、病原菌に決定的な損傷を与えるのではないかと考えられる。現在、土壤中における両物質の存在の証明を行い、作用メカニズムの解明を行っている。

VIII 抗菌物質合成に関係する遺伝子のクローニング

RB 14 株が合成する iturin A や surfactin の合成経路についてはいまだに不明であるが、図-4 に示す構造から、リボゾーム系で合成されるとは考えにくく、非リボゾーム系のマルチエンザイムシステムによる合成が考えられる。我々はまず surfactin の合成に関係した遺伝子のクローニングを試み、RB14 株の染色体遺伝子を枯草菌 *B. subtilis* MI113 にショットガンクローニングを行い、surfactin の合成能力が発現した菌から *lpa-14* という約 1 kb の遺伝子のクローニングに成功した。この方法の詳細は参考文献 [1), 2)] に述べている。MI113 株は iturin A も surfactin も合成しないが *lpa-14* の導入により、surfactin 能のみを回復した。しかも、形質転換体 MI113 の生産する surfactin の量は元株 RB14 の surfactin 生産量より 2 倍以上高くなった。

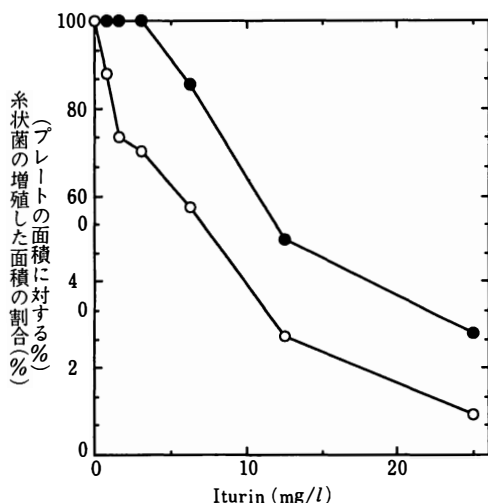


図-8 *Fusarium oxysporum* に対する iturin と surfactin の抗菌活性相乗効果 (PDA 培地 28°C, 6 日間)
—●— iturin A のみ
—○— iturin A + surfactin (50 mg/l)

一方、*lpa-14* を一部変形し、機能を失わせた遺伝子にした後、これをプラスミド pE194 につなぎ RB14 株に導入した。プラスミド pE194 は温度感受性で RB14 株の染色体にランダムに挿入可能である。この結果、RB14 株の surfactin 生産能力を失った変異株がとれたが、この変異株 R41 株は surfactin の生産能力ばかりでなく iturin A の合成能力も同時に失った。この変異株 R41 株に *lpa-14* 遺伝子を再導入すると、この新しい株は iturin A と surfactin の合成能力を回復した。したがって *lpa-14* は iturin A と surfactin との合成の制御を同時につかさどる遺伝子ということができる。現在この遺伝子と類似遺伝子に関して、詳細な解析を行っているが、この遺伝子は枯草菌がつくる鉄キレート物質の制御にも関係していることが解ってきた。すなわち、枯草菌 RB14 株は抗菌物質とバイオサーファクタントの同時生産により、植物病原菌の抑制を行う以外に、鉄キレート物質の生産も行い、病原菌に対して鉄の供給を阻止する作用もあると考えられる。これらの現象が *lpa-14* 遺伝子の制御下にあり、遺伝子の持つ多様性と枯草菌の病原菌抑制メカニズムがかなり複雑であることが解ってきた。

IX 土壌中での枯草菌の挙動(参考文献5))

枯草菌は代表的な土壌微生物とはみなされていないため、枯草菌を人為的に高濃度土壌に施用するとき、土壌中での挙動を詳細に調べた例が少ない。図-2, 3 で示すように、NB22 が土壌中で植物病の抑制作用を発揮していることから、土壌中での菌の変化を追う必要がある。そこで、NB22 の抗生物質耐性突然変異体を作成し、この菌体を土壌に接種し、経時的に生菌数を測定した。枯草菌は栄養状態が良い場合は、栄養細胞の形態をとるが、栄養の枯渇とともに胞子を形成し耐久性を保持する。そこで、栄養細胞を土壌に接種した場合と、胞子を接種した場合とで比較した。

また今後、遺伝子組換え体を用いた微生物農薬の開発を枯草菌で行う場合を考えると、外部から導入したプラスミドの安定性も重要な問題となる。枯草菌によく用いられるプラスミドは pC194, pUB110 などがある。これらは、栄養状態が良い条件では非常に安定であることが明らかになっている。しかし胞子という状態で土壌に施用することを考えると、これらのプラスミドが安定かどうかの情報は今まで得られていない。そこで、組換え体のモデルとして NB22 菌にプラスミド pUB110 および pC194 を形質転換し、それらの形質転換体についても土壌中での挙動とプラスミドの安定性を検討した [参考文献5)]。

その結果 NB22-1 株 (NB22 のストレプトマイシン耐性変異株)、形質転換体 NB22-1 (pUB110), NB22-1 (pC194) それぞれの栄養細胞を平塚土 (砂壤土) に施用したところ栄養細胞は土壌中で速やかに死滅していった。しかしこれら 3 種類の菌の胞子を土壌に接種したとき、菌数はいずれも一定で安定していた。また、プラスミドの安定性は pUB110 は 90% 以上安定に存在したが、pC194 は 50% の安定性しか示さず、プラスミドの選択が重要であることを示した。プラスミドの安定性はプラスミドの大きさ、コピー数などの因子が影響するが、より安定なプラスミドを自然界から探すことも必要であろう。いずれにしても、この結果から、枯草菌の土壌施用により、菌数を安定化させるには、胞子で接種することが望ましいことがわかる。

枯草菌 NB22 株や RB14 株は、iturin A および surfactin を栄養細胞のとき、生産することが解っている。したがって、胞子を施用しても土壌中で実際の植物病原菌に対して抑制作用を示すことは、植物の根圏で胞子が栄養細胞に変化し、抗菌物質を生産することにより、抑制するということが考えられる。

X 最 後 に

日本においては枯草菌を用いた生物防除の報告がほとんど行われていない。枯草菌は納豆菌と類縁であり、日本においては長年にわたって安全性が確かめられてきたといえよう。また特に病原性の報告もなく、遺伝的、かつ生化学的な基礎データは大腸菌に次いで多く、遺伝子組換え体の宿主としても安全性が確認されている。また菌体外に種々の物質を排出するシステムをもつなど、他の菌に無い特徴を有している。しかし、土壌微生物の関係者に注目されにくい原因に土壌の定着性が悪い点が考えられる。これとて微生物農薬として利用する場合や、遺伝子組換え体の野外放出などの場合を考えると土壌定着性の悪さは必ずしも欠点でなくなると思われる。

ここで述べたように、枯草菌による生物防除のメカニズムは当初考えていたものより、かなり複雑なことが解ってきた。今後はこうした、知見をもとに、より効果の高い菌への改良を加えることが望まれよう。

参 考 文 献

- 1) Hiraoka, H. et al. (1992) : J. Ferment. Bioeng. 74 (5) : 323~326.
- 2) Huang, C. C. et al. (1993) : ibid. 76(6) : 445~450.
- 3) Phae, C. G. et al. (1990) : ibid. 69(1) : 1~7.
- 4) Phae, C. G. et al. (1992) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 58(3) : 329~339
- 5) Tokuda, Y. et al. (1995) : Appl. Soil Ecology (印刷中).