

異種微生物間の相互作用および その生物防除への活用の可能性

農林水産技術会議事務局 ^{よし}吉 ^だ田 ^{しげ}重 ^{のぶ}信

はじめに

植物—微生物間相互作用の研究は、植物病原微生物の寄生や根粒菌の共生などに代表されるように、農業生産や人間生活との深い関連性から研究の歴史が古く、植物側あるいは微生物側の反応が分子レベルまで掘り下げられて進められている。一方、自然界においては、微生物同士の相互作用も普遍的に存在し、その形態も競合、中立、共生、協力等様々であることが知られている。しかし、植物—微生物間の相互作用と比べ、微生物間の相互作用については解明が遅れており、さらにその相互作用を人為的に調節することなどにより、人間活動に役立てようとする試みはまだ探究の余地が多く残っているといっても過言ではない。

そうした中で、拮抗微生物を活用した植物病害の生物防除の取り組みは、微生物間の拮抗あるいは競合関係を明らかにしてその利用を図った好例であるが、実際の自然界では病原微生物以外の微生物も含んだ様々な相互作用が存在する。すなわち、生物防除に用いようとする微生物の自然界で示される能力というのは、周囲の様々な微生物との相互作用を経たうえで示される能力であることに留意すべきであり、生物防除の欠点の一つとして挙げられる効果の不安定性は、この複雑な微生物間相互作用の知見や認識の不足に基づいている可能性もある。そうした観点からも、微生物間の相互作用についてさらに多くの可能性を視野に入れた検討が、今後の生物防除研究では必要となってくるのではないだろうか。

ここでは、微生物の組み合わせ、特に分類学的位置づけが異なる微生物間の相互作用、およびその相互作用の場として重要と考えられるバイオフィルムについての特性などを述べるとともに、それらの知見に基づいた複合微生物による生物防除の可能性について論じたい。

I 異種微生物間の協力作用

植物病害の分野における微生物間相互作用として、生物防除で代表されるように、拮抗的あるいは阻害的な相

互作用に関する報告が多くを占める。その一方で、それ以外の相互作用、特に自然界において微生物の生態や働きに影響を及ぼし、病原微生物に対しても重要と考えられる微生物間の協力的作用に関する報告は相対的に少ない。微生物間の協力作用の理解あるいは活用は、生物防除の効果に大きな影響を及ぼす可能性がある。

協力作用については、好熱細菌 *Symbiobacterium thermophilum* の増殖のための異種細菌との共生関係 (OHNO et al., 1999) などが有名であるが、植物病害関連研究でもいくつかの事例が知られている。複数の微生物を組み合わせると生物防除を実施するという試みは、こうした協力作用を活用した手法の一つであるといえ、近年の研究例では、SOMEYA et al. (2007 a ; 2007 b) は、抗菌物質を生産する細菌 (*Pseudomonas fluorescens*) のトマト萎凋病および黄萎病に対する抑止効果が糸状菌に対し溶菌酵素を生産する細菌との共接種によって増強されるということを示している。また、それぞれ単独では拮抗性を示さない微生物同士の組み合わせにより、新たに拮抗性が示されるという事例もあり、de BOER et al. (2007) は、個々では拮抗性を示さないいくつかの土壌細菌において、それらを混合することにより *Fusarium culmorum* や *Rhizoctonia solani* などの糸状菌の生育を *in vitro* で抑制することを明らかにした。このメカニズムとしては、細菌間の相互作用を通じて、抗菌物質が新規に生産されるという可能性が推測されている。これらのように、複数の菌株を組み合わせると生物防除効果の増強を図る知見そのものは数多く知られているものの、そのメカニズムまで正確に解明された例はまだ少ない。微生物を組み合わせた生物防除を実用につなげるためには、組み合わせのパターンや作用機構の解明などのさらなる基礎的な追究が必要である。

一方、病原微生物にとっても、協力作用は生態や病原力の発揮などに重要な役割を果たすことが知られている。後藤 (1996) は、病原細菌を例にその生態における重要性を論じている。具体的事例として、鉄イオンを可溶化する土壌細菌とそれを利用して増殖する根頭がんしゅ病菌の協力作用のほかに、細菌と真核生物の協力作用として、イネ白葉枯病菌と微細藻類を混合培養することにより白葉枯病菌の生存が助長されることが述べられて

Interactions among Different Microbial Species and Their Possible Roles on Biological Control. By Shigenobu YOSHIDA

(キーワード: 微生物間相互作用, バイオフィルム)

いる。このような生物界をまたがった協力関係についてはその他にも報告例があり、コムギふ枯病の病原糸状菌である *Stagonospora* (*Septoria*) *nodorum* の感染において、ヘルパーバクテリア (helper bacteria) と呼ばれる3種の細菌がリパーゼを分泌することによって感染の手助けをしている可能性が示されている (DEWEY et al., 1999)。この発見は、罹病組織からの *S. nodorum* の分離の際にこれらの細菌種が付随して出現するという現象から見いだされたものであるが、本糸状菌とこれらの細菌は言わば「相性のいい間柄」であり、結果的に病勢進展にも貢献する関係であるということが出来る。発病を協力的に助長する微生物に対しては、場合によっては新たな制御方法を検討していく必要があるかもしれない。

このように、協力作用は生物防除エージェントだけではなく病原微生物に対しても存在しうるが、これらの微生物の働きに対しこれまで何の役割ももたないと見なされ、注目されてこなかった微生物の協力作用などの役割を検証することで、さらに新たな微生物の働きが解明されるかもしれない。

II バイオフィーム (複合種で形成される微生物の集合体) の役割

こうした協力作用を含めた複数の微生物の働きを発揮するための重要な形態の一つに、バイオフィーム (以下、BF) が挙げられる。BF とは、一般的には「細胞がマトリックスに包まれた状態で物質の表面や界面に付着して形成される微生物集団」 (COSTERTON et al., 1995) という意味で説明されるものであり、水分と固体表面が共存する場面で遍在的に形成され (森崎, 2005)、各種工業インフラ、食品衛生や医療などの現代生活の多くの分野で様々な影響を及ぼしている。農業環境を含めた自然生態系で形成される BF も、植物の生育促進や、発病に関与したりすることが明らかにされている。生物防除エージェントにとって、ターゲットとする場所や部位に定着および生存することは必須の条件であるが、BF はそうした定着や生存にとって重要な微生物形態であるといえよう。実際に、生物防除と BF の関連性を示唆する報告もあり、ラッカセイの根において BF を形成した *Paenibacillus polymyxa* が黒かび病の発生を抑制し、さらに BF 形成能の高い菌株で抑制活性もより高くなるという研究事例 (HAGGAG and TIMMUSK, 2008) などが知られている。

(1) BF の構成

BF の構成は、微生物細胞とその周囲を取り囲むマトリックスに大別することができる。マトリックスは、

「細菌の細胞表層成分と一体化された重合体」 (ALLISON, 2003) であり、水分のほかに菌体外多糖、核酸、タンパク、糖タンパクやリン脂質等で構成されている。また、BF を構成するもう一方の微生物細胞については、単独種で構成される場合と複合種で構成される場合があり、複合種で構成される BF では、その中に原核生物だけではなく真核生物も含まれる場合もある。自然生態系に存在する BF は、一般に様々な生物種で構成されている場合がほとんどであると考えられており (HOGAN and KOLTER, 2002; 森川, 2003; PARSEK and FUQUA, 2004)、植物体上で形成される BF については、MORRIS et al. (1997) はキクザシヤの葉面で形成される BF の構成種を調べ、複数の細菌種に加えて複数の糸状菌種も構成微生物として含まれることを明らかにしている。

(2) 複合微生物で構成される BF の重要性 — *Burkholderia* sp. NK8 株を例に —

自然界において複合種で構成される BF の内部では、異種微生物間の相互作用が展開されていることが容易に想像できる。一般に BF 状態の細菌は、浮遊状態と比較して、薬剤や環境ストレスに対する耐性や共代謝を介した栄養分の利用能が向上したり、遺伝子伝搬により新たな形質を獲得することなどが知られているが、複合微生物の BF においても、BF の形成の促進に伴い機能性も高まることが知られている。例えば、細菌性肺炎の原因菌として知られる日和見菌の *Pseudomonas aeruginosa* と *Burkholderia cepacia* とで形成される BF において、クオラムセンシングを介した情報伝達などにより病原力が増強されるということが知られている。このことから、有用微生物については、BF の形成を促す別の微生物を活用し人為的に BF の形成を促すことで、有用微生物の働きを活性化できることが考えられる。

そうした可能性を検討した事例として、難分解性芳香族塩素化合物の分解細菌である *Burkholderia* sp. NK8 株を対象に、筆者らが行った研究 (YOSHIDA et al., 2009) について紹介したい。NK8 株は、PCB や塩素系ダイオキシンなどの中間代謝産物であるクロロ安息香酸あるいはクロロカテコール類を脱塩素化する働きをもち、塩素化合物のバイオレメディエーションを図るうえで重要な菌株である。しかし、NK8 株の BF の形成特性およびそれを支配する生物的要因、すなわち他の微生物種の影響については不明であった。上述のように、生態系における BF は、複合微生物種で構成される場合がほとんどであり、微生物の生存・定着や機能性の発揮においては、常に周囲の微生物種との相互作用が関係してくることから、BF の形成に関与する生物的要因の解明は、効果的

なバイオレメディエーションを実践するうえで重要である。まず、NK8 株の BF 形成程度をマイクロプレート法により調べたところ、最少培地などの貧栄養環境下では、BF の形成はごくわずかであることがわかった。そこで、こうした貧栄養環境下で NK8 株と数種の代表的な土壌細菌とを混合培養し、BF の形成程度について検

討を行った。その結果、1 菌株 (*P. aeruginosa* PAO1 株) と混合した場合にのみ、BF の量が有意に相乗的に増加する現象が見られた (口絵①) (YOSHIDA et al., 2009)。また、これら両菌株の混合培養で形成される BF を電子顕微鏡で観察した結果では、各細菌単独種の場合と比べ、細胞数が明らかに増加し、構造もより立体的なものとなり (図-1)、さらにこの複合種 BF における NK8 株細胞の実際の分布を GFP 導入株を用いて調べた結果では、NK8 株細胞は一部でクラスターになっている部分もあったが、基本的には全体にランダムに分布していることもわかった (口絵②) (YOSHIDA et al., 2009)。

これらの結果から、NK8 株は異種細菌と共に形成された BF においても細胞を増加させ、芳香族塩素化合物の分解活性も維持・向上させていることが期待された。そこで、実際に形成された複合種 BF が、芳香族塩素化合物である 3-クロロ安息香酸 (3CB) を分解するかどうかについて HPLC 解析により検討した結果、複合種 BF の 3CB 分解活性は、NK8 株単独で形成させた BF による分解活性よりも有意に高く、培養 3 日後の BF では、対照の 30% 程度まで 3CB 量を減らすことが明らかとなった (図-2)。この高い分解活性の要因としては、NK8 株は異種細菌と協同して BF を形成することで、自身の細胞数をより多く増やすことができるようになり、結果的に分解活性も高まったことが考えられる (YOSHIDA et al., 2009)。

このように、NK8 株において BF の形成および特定の場での機能性 (3CB 分解活性) を発揮するうえで相性の良い微生物の存在が明らかとなったが、生物防除エージェントについても、その BF の形成を促進する異種微生物の組み合わせを検討することにより、機能性発現の向上に結びつく可能性がある。

(3) 生物防除における活用の可能性

上述のように、生物防除エージェントにとって、ターゲットとする場所や部位において定着および生存することは必須の条件であり、BF はそうした定着や生存に重要な微生物形態である。さらに、微生物を組み合わせる生物防除に用いようとする場合、それらの能力・機能を十分に発揮するうえでも、BF の形態は合理的であり、それを有効活用できる可能性が高い。生物防除エージェントの一般的な機作概念として、①競合、②抗生物質生産性、③寄生 (捕食) とある (FRAVEL, 1988) が、特に競合や抗生物質生産性の発揮において BF は重要な役割を果たすと考えられ、生物防除エージェントの BF 形成機構や形成条件を明らかにすることは、効果的な活用を図るうえで極めて重要であるといえる。これまでの生物



図-1 マイクロプレート表面で *Burkholderia* sp. NK8 株と *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を単独および共培養した 3 日後の走査電子顕微鏡像 (YOSHIDA et al. (2009))

接種源: B, NK8 株; P, PAO1 株; B + P, NK8 株 + PAO1 株。

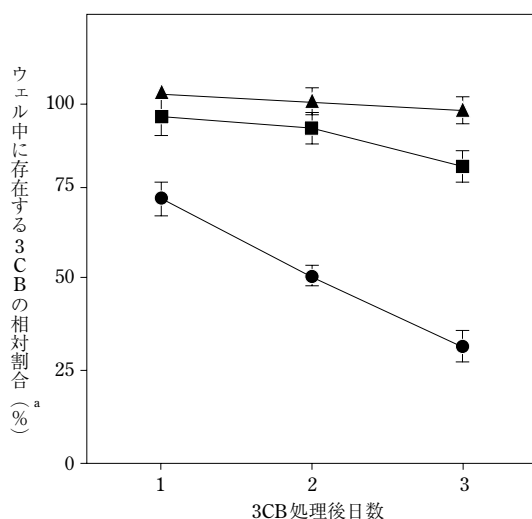


図-2 *Burkholderia* sp. NK8 株と *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の単独および共培養により形成されたマイクロプレートウェル内のバイオフィルムによる 3-クロロ安息香酸 (3CB) の分解程度 (YOSHIDA et al. (2009) を改変)

各接種源の培養により壁面にバイオフィルムを形成させたウェル内に 5 mM 3CB 液を入れ、1～3 日間保持後ウェル中の 3CB 量を測定。a, バイオフィルムを形成していない対照ウェル中の 3CB 量に対する相対割合を示す。接種源; ■, NK8 株; ●, NK8 株 + PAO1 株; ▲, PAO1 株。数値は 3 反復の平均値、バーは標準誤差。

防除研究においても、BF の形成が安定した生物防除効果に重要であることを示唆する報告があり (RUDRAPPA et al., 2008), 実際に製剤化されている生物防除剤でも、その効果が BF 形成とかかわっていると考えられるものも少なくない。製剤の開発において、補助成分などを介した BF 形成のしやすさやその程度も、農業現場での効果発揮において重要な影響を及ぼす可能性がある。また、上述したように、自然界の BF は複合種で構成されている場合がほとんどであるため、BF を活用する場合において、拮抗微生物と複合して形成できる微生物種の特長および複合種での形成メカニズムの把握も重要となつてこよう。

なお、BF を活用した生物防除の一つの戦略として、バイオバリアー (biobarrier) という概念も存在する。バイオバリアーとは、元来微生物浄化の分野において、周辺からの汚染物質の流入を防ぐために未汚染の土壌あるいは地下水脈中に設けられる生物由来の防御壁 (浄化生物の生物帯) を表すが、拮抗微生物を用いた生物防除の場合では、植物体上における拮抗微生物の物理的防御

壁が、ニッチの獲得に基づく発病抑止効果に関連することは容易に想像できる (MORRIS and MONIER, 2003)。篠原 (2008) は、微生物バイオフィルムが根表面に高度に形成された養液栽培トマトにおいて、青枯病の発生が抑制されることを見いだしているが、これは BF がバイオバリアーとして病原菌の根内への侵入を防ぎ、発病抑止に貢献していることを示す好例であるといえる。

III 微生物群集構造の解明の重要性

筆者らのグループは、これまで各種植物体から細菌を中心とした微生物を分離し、その定性・定量情報を微生物インベントリーとして蓄積している。こうした中で、生物防除に関連する知見も多く得られており、例えば ENYA et al. (2007) は、露地栽培トマト葉面に生息している培養可能な細菌群集構造を調べ、その中で優占的に生息する *Pseudomonas* 属細菌と *Pantoea* 属細菌の特定系統が葉かび病に対する生物防除エージェン候補となることを明らかにしている。また、こうした培養可能な細菌群集構造は、イネ (藤本ら, 2006) およびコムギ (吉田ら, 2007) の健全部と糸状菌病害による罹病部とで異なることも明らかにされており、これらの知見は定着や生存性を重視した生物防除エージェン候補を選抜するうえで役立つ情報となりうる。

さらに、微生物の組み合わせを生物防除での応用に活かすためには、こうした自然生態系での微生物群集構造を明らかにすることが、微生物間相互作用の解明のための基礎的情報を提供するという意味で大変貴重となってくる。例えば、ある作物体上において定着性の高い拮抗微生物あるいは拮抗微生物の効果を促進する微生物を探索する場合には、その作物体上で群集を構成する微生物群の中から探索することが実用性を考えるうえで極めて望ましい。さらに、前章までに述べた作物体上におけるシグナル分子によるクオラムセンシングの存在や BF 形成機構などの基礎的研究を効率的に進めていくうえでも、群集構造の情報は解明のための重要なヒントあるいは傍証を提供するものであるといえよう。

一方、近年急速な進歩を遂げている次世代シーケンサーなどを活用したメタゲノム解析も、群集構造や微生物間相互作用の解明および新たな生物防除技術の開発のための基礎研究として期待される。メタゲノム解析では、微生物の分類学的所属に関する情報が得られるだけでなく、機能遺伝子に基づく網羅的な分類や類型化も可能となる。このため、これらの情報を組み合わせることにより、微生物群集構造の立場に基づいた発病の抑止メカニズムの解明や生物防除技術の開発に結びつく可能性が

ある。

お わ り に

異種微生物間の相互作用は、微生物の種類が多岐に及ぶだけでなく、相互関係そのものも多様で複雑であることから、その解明には困難を伴うことが考えられる。このため、生物防除などの応用に生かすためには、地道に基礎的研究を進め、応用研究につなげる知見を集めていくことがまず大切であろう。それを踏まえたうえで、応用技術に結びつくような微生物間の相互作用研究を効率的に進めていくためには、BF研究を通じたアプローチが有効であると考えられる。BFは微生物間の相互作用の場であるだけでなく、自然界での微生物の存在形態として普遍的なものであることから、BFの形態形成メカニズムやBF内部での情報伝達機構を明らかにすることは、微生物間相互作用解明の基礎となるだけではなく、自然界における生物防除を含めた微生物活用技術の開発にも直結しうる可能性がある。今後、BF研究などによる多面的な微生物間相互作用の解明を通じ、より効果的な生物防除手法などの微生物利活用技術が開発されることを期待したい。

引 用 文 献

- 1) ALLISON, D. G. (2003): *Biofouling* 19: 139 ~ 150.

- 2) COSTERTON, J. W. et al. (1995): *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711 ~ 745.
- 3) de BOER, W. et al. (2007): *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 177 ~ 185.
- 4) DEWEY, F. M. et al. (1999): *New Phytol.* 144: 489 ~ 497.
- 5) ENYA, J. et al. (2007): *J. Phytopathol.* 155: 446 ~ 453.
- 6) FRANEL, D. R. (1988): *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 75 ~ 91.
- 7) 藤本義子ら (2006): *日植病報* 72: 246.
- 8) 後藤正夫 (1996): ミクロの世界に魅せられて—植物病原細菌の虚像と実像—, 日本植物防疫協会, 東京, 221 pp.
- 9) HAGGAG, W. M. and S. TIMMUSK (2008): *J. Appl. Microbiol.* 104: 961 ~ 969.
- 10) HOGAN, D. A. and R. KOLTER (2002): *Science* 296: 2229 ~ 2232.
- 11) 森川正章 (2003): *化学と生物* 41: 32 ~ 37.
- 12) 森崎久雄 (2005): *バイオフィルム入門*, 日科技連, 東京, p. 1 ~ 15.
- 13) MORRIS, C. E. and J.-M. MONIER (2003): *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 429 ~ 453.
- 14) ——— et al. (1997): *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1570 ~ 1576.
- 15) OHNO, M. et al. (1999): *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1083 ~ 1090.
- 16) PARSEK, M. R. and C. FUQUA (2004): *J. Bacteriol.* 186: 4427 ~ 4440.
- 17) RUDRAPPA, T. et al. (2008): *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 153 ~ 166.
- 18) 篠原 信 (2008): *化学と生物* 46: 230 ~ 232.
- 19) SOMEYA, N. et al. (2007 a): *Biocontrol Sci.* 12: 1 ~ 6.
- 20) ——— et al. (2007 b): *J. Plant Dis. Protec.* 114: 108 ~ 112.
- 21) 吉田重信ら (2007): *日植病報* 73: 264.
- 22) YOSHIDA, S. et al. (2009): *J. Appl. Microbiol.* 106: 790 ~ 800.

(新しく登録された農薬 14 ページからの続き)

カリフラワー：コナガ、アブラムシ類：収穫 3 日前まで
 レタス：アブラムシ類、ヨトウムシ：収穫 7 日前まで
 リーフレタス：アブラムシ類、ヨトウムシ：収穫 14 日前まで
 たまねぎ：アザミウマ類、ネギコガ、ハスモンヨトウ：収穫 7 日前まで
 ねぎ：アザミウマ類、ネギコガ、シロイチモジヨトウ：収穫 7 日前まで
 ハスカップ：ハマキムシ類、アブラムシ類：収穫 3 日前まで
 アスパラガス：ジュウシホシクビナガハムシ、ヨトウムシ、アブラムシ類：収穫前日まで
 豆類 (未成熟、ただし、さやえんどう、未成熟そらまめを除く)：アザミウマ類、アブラムシ類、ハモグリバエ類、ヨトウムシ類、ウラナミシジミ、フキノメイガ、マメシンクイガ：収穫 14 日前まで
 未成熟そらまめ：アザミウマ類、アブラムシ類、ハモグリバエ類、ヨトウムシ類、ウラナミシジミ、フキノメイガ、マメシンクイガ：収穫 7 日前まで
 さやえんどう：ナモグリバエ、ヨトウムシ類、ウラナミシジミ：収穫前日まで
 ほうれんそう：アブラムシ類：収穫 21 日前まで
 しそ：ハスモンヨトウ、アブラムシ類、アザミウマ類、コナジラミ類：収穫 5 日前まで
 トマト：オンシツコナジラミ、アブラムシ類：収穫前日まで
 ミニトマト：オンシツコナジラミ、アブラムシ類：収穫前日まで

なす：アブラムシ類、オンシツコナジラミ、テントウムシダマシ類：収穫前日まで
 とうがらし類：アブラムシ類、タバコガ：収穫 7 日前まで
 なばな：コナガ：収穫 14 日前まで
 ばれいしょ：アブラムシ類、テントウムシダマシ類：収穫 14 日前まで
 とうもろこし：アワノメイガ、アブラムシ類：収穫 14 日前まで
 あずき：フキノメイガ、アブラムシ類：収穫 7 日前まで
 やまのいも：アブラムシ類、ヤマノイモコガ、アザミウマ類：収穫 7 日前まで
 てんさい：ヨトウムシ：収穫 7 日前まで
 さといも：ハスモンヨトウ、アブラムシ類：収穫 7 日前まで
 かんしょ：イモコガ：収穫 7 日前まで
 茶：チャノコカクモンハマキ、チャノミドリヒメヨコバイ、チャノホソガ、チャノキイロアザミウマ：摘採 14 日前まで
 そらまめ：アブラムシ類：収穫 7 日前まで
 オクラ：ハスモンヨトウ、アブラムシ類、カメムシ類：収穫前日まで
 しるな：アオムシ：収穫 7 日前まで
 みずな：アブラムシ類、ダイコンハムシ、ヤサイゾウムシ：収穫 14 日前まで
 さるなし：キイロマイコガ：収穫 7 日前まで
 つるむらさき：ヨトウムシ：収穫 7 日前まで

(25 ページに続く)