

Pseudomonas fluorescens FPT9601による誘導全身抵抗性機構

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	東山,みや子 大原,裕美子 城戸,剛 西,ゆり子 坂井,玲央菜 相野,公孝 中屋敷,均
発行元	土壤微生物研究会
巻/号	66巻2号
掲載ページ	p. 43-46
発行年月	2012年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



シンポジウム

Pseudomonas fluorescens FPT9601 による誘導全身抵抗性機構東山みや子^{1,2}・大原裕美子²・城戸 剛²・西ゆり子²・坂井玲央菜²・相野公孝³・中屋敷均^{2*}¹ 京都府農林水産技術センター生物資源研究センター, 〒 619-0244 京都府相楽郡精華町大字北稻八間小字大路 74² 神戸大学大学院農学研究科植物病理学研究室, 〒 657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1³ 兵庫県立農林水産技術総合センター, 〒 679-0198 兵庫県加西市別府町南ノ岡甲 1533Systemic plant disease resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* FPT9601Miyako Higashiyama^{1,2}, Yumiko Ohara², Gou Kido², Yuriko Nishi², Reona Sakai²,
Kimitaka Aino³, Hitoshi Nakayashiki^{2*}¹ Biotechnology Research Department, Kyoto Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Center,
74 Oji Kitainayazuma Seika-cho, Kyoto Prefecture, 619-0224, Japan² Laboratory of Plant Pathology, Graduate school of Agricultural Science, Kobe University,
1-1 Rokkodai-cho Nada, Kobe, Hyogo, 657-8501, Japan³ Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries,
1533 Ko, Minaminooka, Befucho, Kasai-shi, Hyogo, 679-0198, JapanKey words : *Pseudomonas fluorescens*, induced systemic resistance

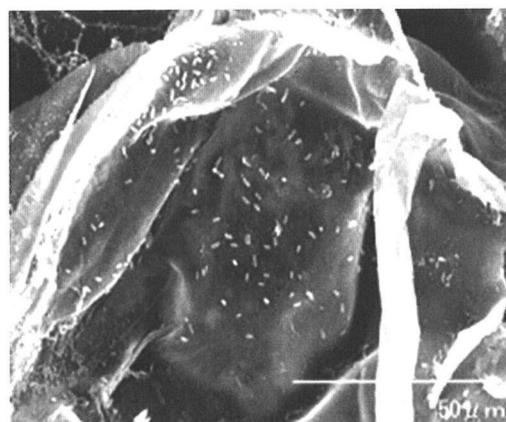
要 約

Pseudomonas fluorescens FPT9601 株は、トマトにおいて植物成長促進根圏細菌として働き、ナス科植物青枯れ病菌に対する抵抗性を付与することで単離同定された。本菌はモデル植物であるシロイヌナズナにおいても、誘導全身抵抗性を引き起こす。シロイヌナズナのサリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA) 及びエチレン (ET) 経路の変異株を用いて調査を行った所、FPT9601 株が誘導する病害抵抗性に JA および ET 経路の関与が示唆された。次に約 23,000 遺伝子のプローブセットによるマイクロアレイ解析を行った結果、2 倍以上の発現変動で上昇した遺伝子が 95 個、低下したものが 105 個であった。その中にオーキシン応答性遺伝子の発現増高が認められ、本菌による植物の成長促進はオーキシンの作用であることが示唆された。この他に二次代謝経路に関わる遺伝子の誘導や抑制、タンパク質合成系遺伝子の抑制などの傾向が認められた。また根粒菌感染で発現が増高することから命名されたノジュリン遺伝子群に含まれる遺伝子の誘導なども見られた。マイクロアレイ解析の結果、FPT9601 感染により発現が上昇していた遺伝子のトランスポゾン挿入変異体における FPT9601 株による誘導全身抵抗性について調査した所、転写因子などいくつかの変異体において、誘導抵抗性の低下が認められた。

1. はじめに

土壌病原菌の生物防除は、環境に低負荷で持続可能な手法であり、臭化メチルの使用禁止に伴う新たな手段として、防除効果の高いエージェントの発見やその処理法の確立が期待されている。植物成長促進根圏細菌 (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: PGPR) は、その名の通り、根圏に共生し、植物の成長を促進する効果のある一群の細菌を指す言葉であり、代表的なものとして *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* や *P. putida* 等に属する細菌の存在が知られている (Handelsman and Stabb, 1996)。植物への

影響は、直接植物ホルモンを介した成長促進の他に、植物の成長を阻害する病原菌への拮抗作用やそれらに対する植物の抵抗性を誘導する効果などがこれまでに報告されている (Bakker *et al.*, 2003; Thomashaw and Weller, 1995; Van Loon *et al.*, 1998)。本研究で用いた *P. fluorescens* FPT9601 (以下 FPT9601 株) は、トマトの青枯病抑制土壌から単離された植物成長促進根圏微生物である (Aino *et al.*, 1997)。本菌はトマト組織内から分離されており、植物における分布様式を電子顕微鏡で調査した所、組織内の細胞間隙を中心に内生していることが示された (Fig. 1)。一方、同菌は根の表面にもマイクロコロニーを形成して多数、存在しており、根の表面と組織内の両方に存在することが明らかとなった。FPT9601 株は、青枯病菌や各種糸状菌等に対して培地上で直接的な生育阻害活性を持っており、少なくともその活性の一部は 2, 4-diacetylphloroglucinol (2, 4-DAPG) による効果であることが示されている (Zhang *et al.*, 2000)。この他にもシデロフォアやプロテアーゼ等の抗菌性物質を分泌することも示されており (Zhang *et al.*, 2000)、対象の菌種によってはそれらも寄与していると考えられる。また一方、FPT9601 株は、植物の全身的な病害抵抗性反応を誘導することも明らかとなっており (Wang *et al.*, 2005)、様々な機構により植物に病害抵抗性を付与していることが示唆さ

Fig 1 SEM image of *Pseudomonas fluorescens* FPT9601 in the intracellular space of tomato roots

2012 年 6 月 22 日受付・2012 年 6 月 22 日受理

* Corresponding author:

E-mail: hnakaya@kobe-u.ac.jp

れている。

2. FPT9601 株による誘導抵抗性のシグナル物質

FPT9601 株は、トマト、ナス、ピーマン等のナス科植物において病害抑制効果を持ち、実用的な農業資材（製品名：セル苗元気）として利用されているが、モデル植物シロイヌナズナにおいても全身的な病害抵抗性を誘導することが示されている (Wang *et al.*, 2005)。そこで当研究室では、FPT9601 株が誘導全身抵抗性を引き起こす分子機構を調査する目的で、分子遺伝学解析に適したモデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究を行っている。まず、FPT9601 株によるシロイヌナズナの誘導全身抵抗性にどのようなシグナル伝達系が関わっているかを明らかにするため、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA)、エチレン (ET) 経路の変異体を用いて *P. syringae* 感染に対する病害抵抗性の変化を調査した。その結果、FPT9601 株によって誘導される病害抵抗性は、SA 経路の変異体である *pad4* や *nahG* では、野生株と変わらないレベルで誘導されたが、JA 経路の変異体である *jar1* や ET 経路の変異体である *ein2* などでは有意な抵抗性の誘導が認められなかった。また、SA, JA, ET すべてのシグナル経路の関与する *npr1* の変異体においても、抵抗性は誘導されなかった。従って、同菌の誘導する全身的な病害抵抗性には JA および ET が介在するシグナルが重要な働きを担っていることが示唆された (Fig. 2)。

次に FPT9601 株感染トマトにおける ET や JA 誘導性遺伝子の

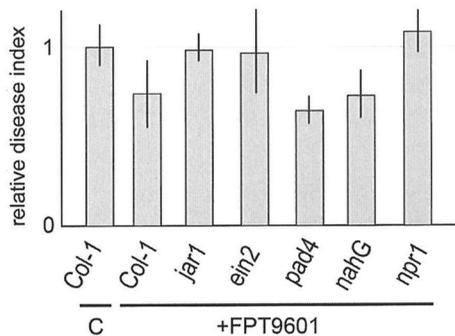


Fig 2 *Pseudomonas fluorescens* FPT9601 triggered induced systemic resistance in Arabidopsis by a signaling pathway involving ethylene and jasmonic acid but not salicylic acid. Wild-type (Col-1) and hormone signaling mutants of Arabidopsis plants with (+FPT9601) or without (C) *P. fluorescens* FPT9601 infection were inoculated with *P. syringae*. Disease index was recorded at 3 days after *P. syringae* inoculation.

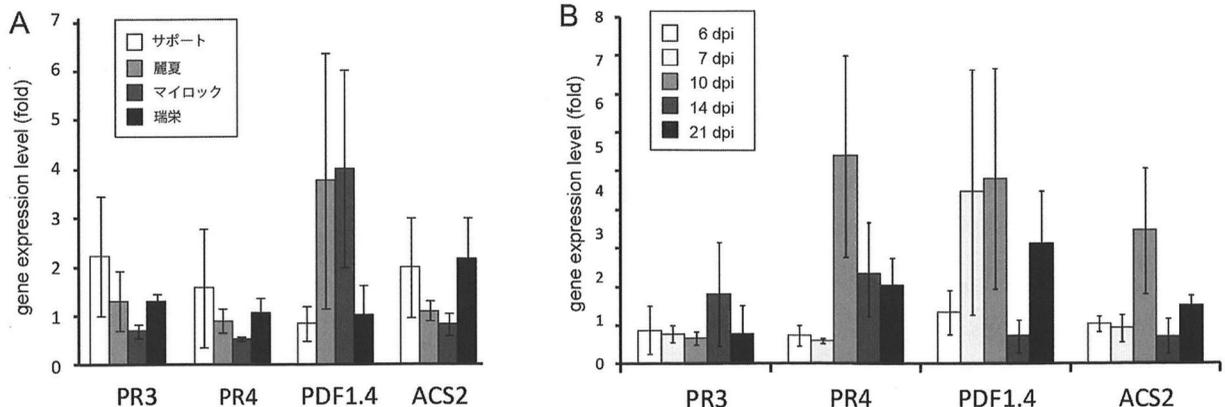


Fig 3 Ethylene-inducible (PR3, PR4, ACS2) and jasmonic acid-inducible (PDF1.4) genes were expressed in tomato infected with *Pseudomonas fluorescens* FPT9601 at varying levels. Gene expression in the graphs was plotted as fold increase relative to untreated controls. (A) gene expression levels in four different tomato cultivars (Support, Reika, Mairokku, Zuiei) at 7 days after inoculation (dpi). (B) those in Mairokku at five different time points (6, 7, 10, 14 and 21 dpi) after *P. syringae* inoculation.

発現レベルを定量 PCR によって調査した。ET 誘導性の ACS2, PR3 および PR4, また JA によって誘導される PDF1.4 を対象に、4 種のトマト品種 (サポート, 麗夏, マイロク, 瑞栄) において、FPT9601 株接種 7 日後における発現量を、コントロール植物と比較した。FPT9601 株の感染により対象遺伝子の発現上昇が認められたが、トマト品種による違いが見られ、サポート及び瑞栄では JA 誘導性遺伝子の発現レベルは低く、ET 誘導性遺伝子の発現レベルが高い傾向にあった。一方、麗夏及びマイロクでは ET 誘導性遺伝子の発現レベルは低く、JA 誘導性遺伝子の発現が非常に高レベルで確認された。このことから、品種によって誘導されやすい経路が異なる可能性が考えられた (Fig.3A)。この点をさらに調査するために、マイロクにおける対象遺伝子の発現を経時的に調査した所、接種 7 日後では JA 誘導性の PDF1.4 の発現上昇が認められたが、接種後 10 日後や 14 日後では、ET 誘導性の PR3, PR4, ACS2 等の発現も顕著に上昇していた (Fig. 3B)。また、PDF1.4 は 14 日後では発現がいったん減少したものの、21 日後には再び上昇していた。このような ET 系および JA 系の遺伝子が経時的に変動して発現する傾向は、他のトマト品種においても観察された (data not shown)。これらのことから、FPT9601 株の感染により JA 及び ET 誘導性の遺伝子が発現するが、その発現は経時的に変動していくことが示唆された。FPT9601 株感染植物では JA/ET 経路により病害抵抗性を誘導するが、常に両経路を活性化させている訳ではなく、植物の状態あるいは菌の感染状態等により、JA や ET のレベルが変動している可能性も考えられた。

これまで様々な PGPR でその全身的な誘導病害抵抗性にどのようなシグナル物質が介在しているのか、本研究と同様の調査が行われている。その結果、*P. fluorescens* WCS417r 株では、本菌と同様に JA および ET が介在していることが示されている (Verhagen *et al.*, 2004)。*P. fluorescens* CHAO 株では JA は関与するが ET は必須ではなく、菌の分泌する DAPG がその誘導に大きな役割を果たしているとされている (Lavicoli *et al.*, 2003)。また、*P. aeruginosa* TNSK2 株による病害抵抗性誘導では SA によるシグナル伝達が必須であることが示されており (De Meyer *et al.*, 1999)、各種 PGPR 菌系により用いられるシグナル伝達系は多様であることが想定されている。本研究では、同一菌による誘導全身抵抗性においても、トマト品種や感染後の時期により、JA や ET に応答する遺伝子が発現変動することが示唆されており、PGPR により誘導される抵抗性のシグナル伝達は様々な条件が関与する複雑な機構であることが考えられた。この条件により遺伝子の発現レベルが変動すること等が、圃場における PGPR 効果の不安定さの一因である可能性も否定できない。

Table 1 Representative genes that were upregulated in Arabidopsis plants colonized by *Pseudomonas fluorescens* FPT9601

Annotation	Fold-change ratio	AGI number
METABOLISM		
seed imbibition protein	3.14	At5g20250
putative fatty acid elongase	2.87	At2g28630
putative glutathione S-transferase	2.66	At2g02930
beta-xylosidase	2.52	At1g02640
xyloglucan endotransglycosylase	2.38	At3g23730
beta-galactosidase	2.33	At5g56870
putative endoxyloglucan glycosyltransferase	2.27	At2g06850
xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase precursor	2.22	At4g30270
flavanone 3-hydroxylase-like protein	2.12	At5g24530
beta-glucosidase	2.08	At1g02850
putative trans-caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase	2.07	At1g67980
TRANSCRIPTION		
GATA transcription factor	2.39	At4g26150
NAM (no apical meristem)-like protein	2.38	At2g17040
RING zinc finger protein-like	2.27	At5g41400
bZIP transcription factor ATB2	2.22	At4g34590
putative WRKY-type DNA binding protein	2.02	At2g30250
CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES		
unknown protein contains Plant lipid transfer protein motif	3.71	At3g22600
Ca ²⁺ /H ⁺ -exchanging protein-like	2.85	At3g51860
dynein light chain-like protein	2.39	At5g20110
major intrinsic protein (MIP)-like nodulin-26	2.10	At4g10380
CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM		
protein kinase similar to receptor-like protein kinase RLK3	2.75	At3g45860
cbp1 like calcium-binding protein	2.50	At5g39670
putative calcium-binding protein	2.07	At1g21550
protein kinase similar to wall-associated kinase 4	2.00	At3g57700
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE		
drought-induced protein like	4.80	At4g15910
hevein-like protein precursor (PR-4)	4.76	At3g04720
beta-1, 3-glucanase 2 (BG2) (PR-2)	3.22	At3g57260
endochitinase isolog	2.61	At2g43570
beta-1, 3-glucanase	2.50	At3g57240
similar to small proteins induced by heat, auxin, ethylene and wounding	2.36	At4g02380
putative cytochrome P450	2.32	At2g26710
DEVELOPMENT (Systemic)		
NAM / CUC2-like protein CUC2	2.56	At5g39610
nodulin MtN21 family protein	2.39	At1g01070
unknown protein similar to N-term half of NAC domain protein NAM	2.30	At1g69490
NAM-like protein (no apical meristem) similar to NAM	2.16	At3g04070
Unclassified or unknown protein		
putative protein contains similarity to carboxyl-terminal proteinase	9.19	At5g05030
putative auxin-induced protein	4.35	At4g36110
nodulin-like protein	3.16	At2g16660
putative trypsin inhibitor	2.80	At2g43510
putative auxin-regulated protein	2.70	At2g33830
nodulin-like protein	2.59	At5g25260

3. FPT9601 株により発現誘導される宿主遺伝子のマイクロアレイ解析

次に FPT9601 株により引き起こされる遺伝子発現変動をゲノムワイドで解析するために、シロイヌナズナの 22,810 遺伝子を対象とした Affymetrix 社のプローブセットによるマイクロアレイ解析を行った。その結果、2 倍以上の変動幅で発現上昇した遺伝子が 95 個、低下したものが 105 個同定された。その一部を Table 1 に示した。発現上昇した遺伝子の中には、オーキシン応答性の遺伝子である At4g36110 や At2g33830 等が含まれており、本菌による植物の成長促進はオーキシンの作用によるものであることが示唆された。また、オーキシンの作用により細胞壁分解・合成酵素も制御されていることが示されており (Catala *et al.*, 1997), 本研究でも xyloglucan endotransglycosylase (At2g06850) 等の発現上昇が認められ、符号する結果となった。Carteaux ら (2003) は、

PGPR である *P. thivervalensis* MLG45 を用いたマイクロアレイ解析を行い、その結果、やはりオーキシン応答性の遺伝子の発現上昇を観察している。従ってこのオーキシンによる成長促進効果は、*Pseudomonas* 属菌の PGPR で広く認められる性質なのかもしれない。FPT9601 株が直接オーキシン活性を持った物質を分泌するのか、植物のオーキシン分泌を促進するような活性を持っているのかは不明であり、今後の検討が必要な課題である。

また、病害抵抗性に関しては、PR 蛋白質 (At2g43570, At3g04720, At3g57240, At3g57260) や WRKY 転写因子 (At2g30250) などの病害抵抗性に関連することが知られている遺伝子や抗菌性物質の合成に関与する可能性のある二次代謝経路に関わる遺伝子 (At5g24530, At1g67980, At2g26710) 等の発現誘導が認められた。PR4 を代表とするように、これら遺伝子のいくつかは ET/JA シグナル経路で誘導されることが知られており、Fig.2 や Fig.3 で得られた結果と一致しているが、マイクロアレイの解析結果から

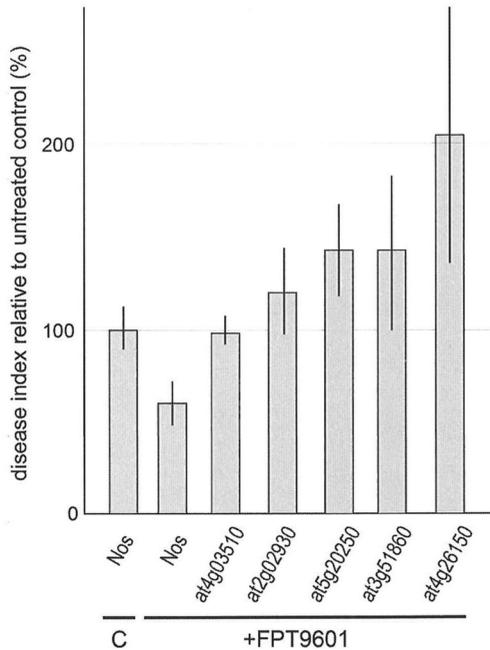


Fig 4 *Pseudomonas fluorescens* FPT9601 failed to induce systemic disease resistance in some transposon insertional Arabidopsis mutants. Wild-type (Nos, Nossen) and transposon insertional mutants of Arabidopsis plants with (+FPT9601) or without (C) *P. fluorescens* FPT9601 infection were inoculated with *P. syringae*. Disease index was recorded at 3 days after *P. syringae* inoculation.

はいくつかの ET 応答性遺伝子の発現が低下していることも示されており (data not shown), ここでも PGPR により誘導される抵抗性のシグナル伝達の複雑性が示唆されている。ここまで述べたように、遺伝学的な解析から、ET/JA シグナル系が関与することは支持されており、この経路に属する遺伝子に発現変動があることも確認されているが、例えば ET や JA 等を直接植物に処理した際の遺伝子変動とは明らかに異なっており、単純なモデルで説明することは難しい結果となっている。

興味深いことに、今回の解析で、根粒菌感染で発現が増高するノジュリンと命名された一群の遺伝子と相同性を持つ遺伝子 (At1g01070, At2g16660, At4g10380, At5g25260) の発現が、FPT9601 株感染により誘導されていることが明らかとなった。ノジュリン遺伝子群の機能は、まだ多くが不明であるが、少なくとも一部は根粒形成における代謝や形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある (Charon *et al.*, 1997; Guenther *et al.*, 2003)。今回、発現増高が観察されたノジュリン様遺伝子の機能は不明であるが、PGPR と根粒菌という異なった細菌の植物との共生に、少なくとも一部共通するメカニズムがあることが示唆された。

4. FPT9601 株による誘導全身抵抗性に必須な遺伝子の同定にむけて

最後に、マイクロアレイ解析の結果、発現が上昇していた遺伝子の FPT9601 株感染における役割を明らかにする目的で、該当遺伝子のトランスポゾン挿入変異体を理研バイオリソースセンター (BRC) から分譲を受けて、解析を行った。発現上昇していた遺伝子の内 18 個を、理研 BRC におけるトランスポゾン挿入変異体の有無、発現上昇の程度、推定される遺伝子機能等を参考に選抜した。これらのトランスポゾン変異体における FPT9601 株のシロイヌナズナにおける定着および誘導抵抗性を調査した所、定着能についてはいずれも大きな変化は認められなかったが、誘

導全身抵抗性は 5 つの遺伝子 (At1g69490, At3g51860, At4g26150, At5g20250, At5g24530) の変異体において有意に低下していた。これらの遺伝子は、転写因子やカルシウム・プロトン交換輸送体等の情報伝達に関わるものや糖代謝・二次代謝等に関わるものを含んでいた。これらの遺伝子が、FPT9601 株による誘導全身抵抗性においてどのような役割を果たしているのか、その詳細は不明であり、今後の主要な検討課題としたい。

引用文献

- 1) Aino M, Maekawa Y, Mayama S and Kato H (1997) Biocontrol of bacterial wilt of tomato by producing seedlings colonized with endophytic antagonistic pseudomonas. *In* Proceedings of the 4th international workshop on PGPR, Eds. A Ogoshi, K Kobayashi, Y Homma, F Kodama, N Kondo and S Akino, p120-123, Nakanishi Printing, Sapporo, Japan
- 2) Bakker P, Ran LX, Pieterse CMJ and van Loon LC (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.*, **25**, 5-9
- 3) Carteaux F, Thibaud MC, Zimmerli L, Lessard P, Sarrobert C, David P, Gerbaud A, Robaglia C, Somerville S and Nussaume L (2003) Transcriptom analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *Plant J.*, **36**, 177-188
- 4) Catala C, Rose JK and Bennett AB (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1, 4-β-D glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J.*, **12**, 417-426
- 5) Charon C, Johansson C, Kondorosi E, Kondorosi A and Crespi M (1997) ENOD40 induces differentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 8901-8906
- 6) De Meyer G, Audenaert K and Höfte M (1999) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur. J. Plant Pathol.*, **105**, 513-517
- 7) Guenther JF, Chanmanivone N, Galetovic MP, Wallace IS, Cobb JA and Roberts DM (2003) Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*, **15**, 981-91
- 8) Handelsman J and Stabb EV (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, **8**, 1855-1869
- 9) Lavicoli A, Boutet E, Buchala A and Mettraux JP (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **16**, 851-858
- 10) Thomashaw LS and Weller DM (1995) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: Mechanisms and antifungal metabolites. *In* Plant-Microbe Interactions Vol.1, Eds, G Stacey and N Keen, p.187-235. Chapman and Hall, New York, USA
- 11) Van Loon LC, Bakker P and Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **36**, 453-483
- 12) Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC and Pieterse CMJ (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **17**, 895-908
- 13) Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y and Mayama S (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **18**, 385-396
- 14) Zhang L, Tosa Y, Nakayashiki H and Mayama S (2000) Antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol played an important role in biocontrol ability of *Pseudomonas fluorescens* FPT9601. *Ann. Report Interdiscipl. Res. Inst. Environ. Sci.*, **19**, 151-163