

拮抗性Bacillus属細菌を利用した植物病害の生物防除機能性物質とその防除メカニズムを中心に

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	横田,健治
発行元	土壤微生物研究会
巻/号	66巻1号
掲載ページ	p. 27-31
発行年月	2012年4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



解説

拮抗性 *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害の生物防除
機能性物質とその防除メカニズムを中心に

横田健治*

東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科, 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Functions of antimicrobial lipopeptides produced by antagonistic
Bacillus spp. in suppression for plant diseases

Kenji Yokota

Faculty of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1
Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo, 156-8502, Japan

1. はじめに

Bacillus 属細菌の一部の菌株は、他の微生物に対して拮抗性を示すことが知られている。それら拮抗性 *Bacillus* 属細菌を農薬として植物病害の防除に利用する試みについては、多くの報告例がある (e.g., Idris *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011)。2011年12月現在、微生物農薬として登録されている *Bacillus* 属細菌を原料とした製剤は13種類ある。これら *Bacillus* 製剤を含む微生物農薬については、2003年に施行されたポジティブリスト制度や、地球規模での環境保全を目的とした化学農薬の使用規制が強化されたことなどをを受け、化学農薬の代替として期待されている。

現在、登録されている *Bacillus* 属細菌を使用した微生物農薬は、イネのイネもみ枯細菌病及び苗立枯細菌病を適用病害とする1製剤を除き、うどんこ病や灰色かび病などの葉面病害を適用病害としている。土壌病害を対象とした病害抑制効果については、研究事例としては見受けられるが、微生物農薬として土壌病害を適用病害とした *Bacillus* 製剤は無い。

本報では、拮抗性 *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害抑制に関する知見を紹介して、土壌病害に対する *Bacillus* 製剤の利用の可能性について考察したい。なお、微生物農薬として使用されている *Bacillus* 属細菌を使用した製剤には、*B. thuringiensis* を使用した殺虫剤があるが、本報では、微生物に対して効果を示す拮抗性 *Bacillus* 属細菌について記載する。

2. 拮抗性 *Bacillus* 属細菌が生産する抗生物質

1) 抗生物質の種類と構造

Bacillus 属細菌の拮抗性については、研究の歴史が長く、これまでにいくつかの抗生物質が単離され、構造決定がな

されている。特にペプチド性の抗生物質については50年以上前にその存在が認められている (Babad *et al.*, 1952; Sharon *et al.*, 1954)。*Bacillus* 属細菌が生産するペプチド性抗生物質には、環状リポペプチド (cyclic lipopeptide) とランチビオティック (lantibiotics) の2種類が挙げられる。

Bacillus 属細菌が生産する環状リポペプチドの種類と構造を図1に示した。これら環状リポペプチドは構造の特徴から、3つのファミリーに分類される (Romero *et al.*, 2007)。Surfactin ファミリーは surfactin のみからなり、7アミノ酸のペプチドと β -ヒドロキシ脂肪酸が環状構造をとる。Iturin ファミリーは iturin, bacillomycin, mycosubtilin で構成され、これらは7アミノ酸のペプチドと β -アミノ脂肪酸からなる。これら2つのファミリーに分類される環状リポペプチドは脂肪酸 β -位の官能基がペプチドと結合することにより、環状構造をとる。一方、fengycin ファミリーは、fengycin と plipastatin から構成され、オルニチンを含む10アミノ酸のペプチドが分子内で環状構造をとり、N末端に β -アミノ脂肪酸が結合した構造をとる。これら環状リポペプチドの中で最も疎水性の高い分子は surfactin であり、次いで fengycin ファミリー、iturin ファミリーとなる (Tsuge *et al.*, 2005)。複数の化合物で構成されるファミリーはそのペプチド鎖のアミノ酸残基の相違に起因する (Stein, 2005)。環状リポペプチドの抗菌スペクトルについては、surfactin が抗細菌活性を示す一方で、他の分子は各種植物病原性糸状菌を含む広範な抗真菌活性と抗細菌活性を示す (Velho *et al.*, 2011)。

ランチビオティックは、様々なグラム陽性細菌が生産する抗生物質である (Lee and Kim, 2011)。ランチビオティックは分子内にジスルフィド結合を持ち、その生合成は、DNA から転写、翻訳されたペプチドが、修飾を受け、分子内にチオエーテルアミノ酸であるランチオニンおよびメチルランチオニンを生成し、分子内ジスルフィド結合を形成する。これらの分子は細菌に対して広範な抗菌スペクトルを示し、専ら、医薬や食品保蔵の分野で応用に関する研

2012年1月9日受付・2012年1月20日受理

* Corresponding author.

E-mail: yokota@nodai.ac.jp

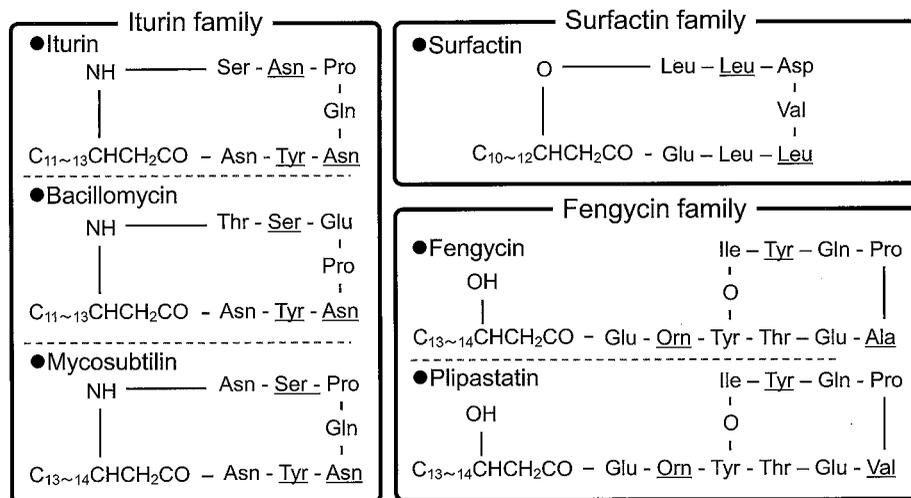


図1 *Bacillus* 属菌が生産する抗菌性リポペプチド下線はD型アミノ酸を示す。

表1 拮抗性 *Bacillus* 属細菌が抑制する植物病害の報告例と生産する環状リポペプチドの種類

病害名	病原菌名	環状リポペプチド	参考文献
糸状菌病			
モモ灰星病菌	<i>Monilinia fructicola</i>	iturin	Gueldner <i>et al.</i> (1988)
トマト根腐萎ちょう病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	iturin	Phae <i>et al.</i> (1992)
トマト苗立枯病	<i>Rhizoctonia solani</i>	iturin, surfactin	Asaka <i>et al.</i> (1996)
クワ炭疽病	<i>Colletotrichum dematium</i>	iturin	Yoshida <i>et al.</i> (2002)
リンゴ灰色かび病	<i>Botrytis cinerea</i>	fengycin, iturin, surfactin	Touré <i>et al.</i> (2004)
トマト苗立枯病	<i>Pythium aphanidermatum</i>	mycosubtilin	Leclère <i>et al.</i> (2005)
トマト根腐萎ちょう病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	fengycin, iturin, surfactin	Cazorla <i>et al.</i> (2007)
キュウリつる割病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	iturin	Chung <i>et al.</i> (2008)
トウガラシ疫病	<i>Phytophthora capsici</i>	iturin	Chung <i>et al.</i> (2008)
赤かび病	<i>Fusarium graminearum</i>	fengycin	Chan <i>et al.</i> (2009)
細菌病			
トマト青枯病	<i>Ralstonia solanacearum</i>	iturin	Phae <i>et al.</i> (1992)
シロイヌナズナ根部病害	<i>Pseudomonas syringae</i>	surfactin	Bais <i>et al.</i> (2004)

究がなされており、植物病害防除への応用例は見受けられない。一方、前述の環状リポペプチドについては、植物病害抑制効果を示す拮抗性 *Bacillus* 属細菌の菌株のほとんどが生産することから、ポストハーベストを含む農業生産分野で注目される物質である。

2) 環状リポペプチドの生合成機構

Bacillus 属細菌が生産する環状リポペプチドは、全て、リボソーム非依存型ペプチド合成系 (non-ribosomal peptide synthesis) により生合成される (Stein, 2005)。*Bacillus* 属細菌の環状リポペプチドについては、既に生合成遺伝子が同定されている (Stein, 2005)。その生合成は、巨大なタンパク質複合体 (例えば、surfactin の場合、SrfA (402kDa) と SrfB (401kDa), SrfC (144kDa) からなるヘテロ三量体) 内で、アミノ酸を1つずつ付加しながら、ペプチド鎖を伸長させ、伸長反応の終了後に環化される。ペプチド鎖の伸長は、触媒活性化ドメイン、結合ドメイン、伸長ドメインから構成されるモジュール1セットが1アミノ酸の伸長に対応し、リポペプチドのアミノ酸の

数だけモジュールが存在する。モジュール内にはエピマー化に関するドメインが存在する事があり、その作用により、D-アミノ酸がペプチド鎖を構成することとなる (Sieber and Marahiel, 2003)。

3. *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害抑制効果

Bacillus 属細菌を利用した植物病害抑制効果については、これまでに多くの報告例がある。それら植物病害抑制能を示す菌株には、ほぼ共通して見出される特徴として、植物病原性微生物に対する拮抗性が挙げられる。表1には、これまでに病害抑制効果が認められた対象病害と病原菌、および環状リポペプチドの種類を示した。*Bacillus* 属細菌により抑制効果が認められる病害は、糸状菌病と細菌病、及び葉面病害と土壌病害を問わず、広範な種類の植物病害に対して抑制効果が報告されている。拮抗性 *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害抑制メカニズムが拮抗性に依存すると仮定して、これらの対象病害の病原菌と環状リポペプチドの種類の関連性を見ると合理的である。すなわち、広

範な植物病原性糸状菌に対して抗真菌活性を示す *iturin*, *mycosubtilin*, *fengycin* の生産菌株は、糸状菌病に対する病害抑制効果を示し、抗細菌作用を示す *surfactin* 生産菌株は、*Pseudomonas syringae* による細菌病に対して抑制効果を示す。Phae *et al.* (1992) が報告したトマト青枯病 (病原菌 *Ralstonia solanacearum*) に対する *iturin* 生産菌株の病害抑制効果については、その菌株の培養上清に、抗細菌活性が認められており、使用した *Bacillus* 属菌株の *surfactin* 生産性は評価されていないが、前述通り、*Bacillus* 属菌はファミリーの異なる複数の環状リポペプチドを生産する事があるので、供試菌株が *surfactin* を生産する可能性が十分に考えられる。

Mizumoto *et al.* (2007) は、*iturin* 生産性を示す菌株を用いて、*iturin* 生産量の異なる培地組成で培養した *iturin* 濃度の異なる培養液を調製して、トマト根腐萎凋病 (病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) の病害抑制効果を検証した。そして、土壌への *iturin* の添加量が病害抑制能と関連性を示すことを指摘している。このことは *iturin* を含む環状リポペプチドが土壌病害に対して抑制効果の主体となることを示唆している。

しかし、環状リポペプチドが土壌病害を抑制する直接的なデータは見当たらない。例えば、精製した環状リポペプチドを土壌に添加して病害抑制効果を示すといったデータの報告例はなく、培養物や培養菌体、培養上清の病害抑制効果の報告にとどまっている。

また、前述の Phae *et al.* (1992) の報告では、栽培跡地中の病原菌密度の計測結果を示しており、顕著な病害抑制効果を示す *Bacillus* の培養物を施用した試験区でも土壌中の糸状菌密度の低下は若干量に限られており、環状リポペプチドの土壌への添加による抗真菌活性が植物病害抑制メカニズムの主要因となりうるかには疑問が持たれる。

4. 拮抗性 *Bacillus* 属細菌の新規植物病害抑制メカニズム

Jourdan *et al.* (2009) により、環状リポペプチド *surfactin* の植物病害抑制における新規のメカニズムとして、植物細胞への病害抵抗性誘導活性が報告された。タバコ培養細胞に対して *surfactin* を μM オーダーで作用させることにより、培養液 pH の上昇、 H_2O_2 の発生、PAL (フェニルアラニンアンモニアリアーゼ) 活性の上昇とフェノール化合物の生成が確認された。なお、*iturin* 及び *fengycin* については、上述のタバコ培養細胞に対する病害抵抗性誘導活性は認められないと併せて報告されている。以前まで、植物の病害抵抗性誘導を引き起こすエリシター分子の定義として、病原菌に対する抗真菌活性及び抗細菌活性を示さないことが挙げられていたが、*Bacillus* 属細菌が生産する抗菌性環状リポペプチド *surfactin* は植物病原性細菌に対する抗菌性と宿主植物への病害抵抗性誘導活性の2つの機能を示す分子となる。

病害抵抗性誘導は、エリシター分子の接触を認識した植物の部位からエチレンやジャスモン酸、サリチル酸などの

シグナル分子を植物個体の全身へ行きわたらせ、植物個体全身で病原菌に対する防御反応を誘導的に示すことが知られている (Vallad and Goodman, 2004)。

植物の病害抵抗性誘導能を土壌病害の抑制に応用した例として、El-Khalla (2007) は、トマト萎凋病 (病原菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) を対象病害として、宿主植物のシグナル分子であるジャスモン酸もしくはサリチル酸を地上部へ処理することにより、根部で感染、発症する本病害に対して抑制効果を示すことを報告している。

前述の通り、*in vitro* で認められる環状リポペプチドの抗真菌活性及び抗細菌活性は、土壌病害を対象とした拮抗性 *Bacillus* 属細菌の植物病害抑制メカニズムの主要因となるか、依然として不明であるが、一方で、環状リポペプチドによる宿主植物の病害抵抗性誘導能は、今後、土壌病害を対象とした *Bacillus* 製剤の利用において、注目すべき事項であると考えられる。

5. おわりに

微生物農薬は、化学農薬と比較して、病害抑制効果が緩慢で、効果の再現が取りにくいと言われる。その効果に即効性や確実性を期待することは不可能なのか？

生物農薬は、化学農薬と異なり、その病害抑制メカニズムが不明なものが多い。特に微生物農薬は、病害抑制に関与する機能性物質の同定や作用メカニズムが未解明のものが多く、今後、病害抑制効果を示す各種菌株について、多面的な解析をすることにより、新規メカニズムの発見につながる可能性を秘めている。

拮抗性 *Bacillus* 属細菌を使用した土壌病害抑制に関しては、前述の環状リポペプチドの宿主植物に対する病害抵抗性誘導能を考慮すると、比較的定着しやすいと考えられる地上部へ *Bacillus* 菌体を処理することにより、宿主植物の全身へ病害抵抗性を誘導し、土壌病害を含む各種病害に対して抑制効果を示すことも期待できる。その場合、*Bacillus* に由来する機能性物質の適正濃度を詳細に解析する必要がある。

また一方で、有用菌株については、宿主植物に対する定着性のみならず、機能性物質をいかに生産させるかにも注目すべきと考える。*Bacillus* 属が生産する環状リポペプチドは、全てが二次代謝産物であり、その生合成に環境要因が大きく影響することも予想される。Ohno *et al.* (1992) は、小麦ふすまを培養基質として固体培養における *Bacillus* 属細菌の *iturin* 生産性を解析しており、*iturin* が対数増殖期後期に生産されること、及び固相環境では、液体培養と比較して、高い *iturin* 生産性を示すことを報告している。土壌環境下における *Bacillus* 属細菌の環状リポペプチド生産性に関する報告は見当たらないが、今後、環状リポペプチド生産性に対する土壌の化学性や物理性の影響、根圏における環状リポペプチドの生産性を解析する必要がある。

化学農薬の使用量が規制される中で、微生物農薬に化学農薬ほどの万能的な効果を期待することは難しいかもしれ

ないが、微生物農薬の病害抑制メカニズムを精査することで、化学農薬の使用量を低減できる様な総合的防除対策に貢献することを期待する。

要 旨

拮抗性 *Bacillus* 属細菌が生産する環状リポペプチドについて、その種類と植物病害防除における機能について紹介した。*Bacillus* 属細菌が生産する環状リポペプチドには、複数の分子種が知られており、細菌もしくは真菌類に対して広範な抗細菌活性もしくは抗真菌活性を示す。これら抗細菌性環状リポペプチドは拮抗性 *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害抑制効果の主体となることが示唆されている。しかし、これら環状リポペプチドの抗菌性が直接的に植物病害抑制に関与する実験結果は見当たらない。その一方で、抗菌性環状リポペプチドの新規の機能として、宿主植物に対する病害抵抗性誘導能が報告された。この機能は拮抗性 *Bacillus* 属細菌を利用した植物病害抑制効果において重要な役割をはたすことが示唆される。

引用文献

- Asaka O and Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4081-4085
- Babad J, Pinsky A, Turner - Graff R and Sharon N (1952) An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Nature*, **170**, 618-619
- Bais HP, Fall R and Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.*, **134**, 307-319
- Cazorla FM, Romero D, Pérez - García A, Lugtenberg BJJ, de Vicente A and Bloemberg G (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 1950-1959
- Chan Y - K, Savard ME, Reid LM, Cyr T, McCormick WA and Seguin C (2009) Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. *Biocontrol*, **54**, 567-574
- Chung S, Kong H, Buyer JS, Lakshman DK, Lydon J, Kim S and Roberts DP (2008) Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 115-123
- El - Khallal SM (2007) Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 1 - changes in growth, some metabolic activities and endogenous hormones related to defence mechanism. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **1**, 691-705
- Guedner RC, Reilly CC, Pusey PL, Costello CE, Arrendale RF, Cox RH, Himmelsbach DS, Crumley FG and Cutler HG (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 366-370
- Idris HA, Labuschaghe N and Korsten L (2007) Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control*, **40**, 97-106
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet - Imbert M and Jacques P (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4577-4584
- Lee H and Kim H - Y (2011) Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 229-235
- Mizumoto S, Hirai M and Shoda M (2007) Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1267-1274
- Ohno A, Ano T and Shoda M (1992) Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid - state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. *Biotechnol. Lett.*, **14**, 817-822
- Peypoux F, Bonmatin JM and Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 553-563
- Phae CG, Shoda M, Kita N, Nakano M and Ushiyama K (1992) Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **58**, 329-339
- Roberts PD, Momol MT, Ritchie L, Olson SM, Jones JB and Balogh B (2008) Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar - S - methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato. *Crop Prot.*, **27**, 1519-1526
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M and Pérez - García A (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Mol. Plant - Microbe Interact.*, **20**, 430-440
- Sharon N, Pinsky A, Turner - Graff R and Babad J (1954) Classification of the antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis*. *Nature*, **174**, 1190-1191
- Sieber SA and Marahiel MA (2003) Learning from nature's drug factories: Nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J. Bacteriol.*, **185**, 7036-7043
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, **56**, 845-

857

- 21) Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A and Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 1151-1160
- 22) Tsuge K, Inoue S, Ano T, Itaya M and Shoda M (2005) Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 4641-4648
- 23) Vallad GE and Goodman RM (2004) Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.*, **44**, 1920-1934
- 24) Velho RV, Medina LFC, Segalin J and Brandelli A (2011) Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiol.*, **56**, 297-303
- 25) Yoshida S, Shirata A and Hiradate S (2002) Ecological characteristics and biological control of mulberry anthracnose. *JARQ*, **36**, 89-95
- 26) Zhang J, Xue AG, Morrison MJ and Meng Y (2011) Impact of time between field application of *Bacillus subtilis* strains SB01 and SB24 and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on the suppression of *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Eur. J. Plant Pathol.*, **131**, 95-102