

## イネと強い関係性を示す *Burkholderia* 属細菌類の 機能性・代謝制御に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 立花 誠治

1)はじめに 本研究は, *Burkholderia plantarii* がフェニル酢酸 (PAA) を前駆体として産生するトロポロンによって引き起こされるイネ苗立枯細菌病防除を目的として, PAA 構造類似化合物のライブラリーからトロポロン産生抑制活性を示すものを探索した。また, *B. plantarii* のトロポロン生合成中間体探索で見出したトロポロン産生亢進化合物の単離精製とその同定を行った。これらの活性評価のため, トロポロンとその主要な生合成中間体である PAA を同時に測定でき, 極めて信頼性の高い定量法を確立した。一方, 岡山大学資源植物科学研究所の無施肥水田実験圃場で, 無施肥で高収量を示す交雑後代イネLIA-1について, その穂ばらみ期イネ根内で高い優占率を示す窒素固定細菌 *Burkholderia kururiensis* の分離を試み, その機能性を調べた。*B. kururiensis* は, DNA による菌叢解析では高優占率を示すものの, 分離困難であった。この菌株が難培養性である原因を探りつつ, 当該細菌の分離を試みた。また NGS 解析により, 各生育ステージにあるイネ根での *B. kururiensis* 優占率の変動と, その伝播経路の解明を試みた。

2)方法と結果 *B. plantarii* 菌体を 0.1 mM  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  が添加された MWG (Winogradsky's 無機塩-ショ糖-ジェランガム) 培地に混ぜ込んで培養すると, 産生されたトロポロンが 3 価鉄イオンと錯塩を形成し, 安定な黒色粒状結晶がプレート中に均一に析出する。これをトロポロン産生抑制試験用培地として用いるペーパーディスク試験 (1 mmol/disc) により, PAA アナログ体のうち (*p*-isopropylphenyl)acetic acid, (±)-2-phenylpropionic acid, ならびに indole-3-acetic acid に強いトロポロン-鉄錯体析出阻害が観察された。PDB (ポテト-デキストロースブロー) 振盪培養による各化合物 (終濃度 0.5 mM) 添加時のトロポロンおよび PAA 量を定量し, これら PAA アナログにより PAA 産生抑制もしくは PAA からトロポロンへの変換抑制を明らかにした。機序の異なる二つの PAA アナログ化合物を同時添加したところ, 非常に強いトロポロン産生抑制が認められた。また, *B. plantarii* 代謝産物中に, トロポロン産生亢進化合物としてプロトカテク酸を同定した。一方, MWG 平板を用い, 穂ばらみ期の LIA-1 根組織を 100 万倍希釈したものからはじめて *B. kururiensis* の分離に成功した。*B. kururiensis* はイネ存在下で高い窒素固定能を示した。また, イネ根内への当該細菌の侵入を蛍光染色により確認できた。イネ根から同時に分離した *Burkholderia vietnamiensis* は, PDA 平板培地では *B. kururiensis* に対して強い生育阻害を示すものの, MWG 平板培地ではその生育阻害が軽減された。また NGS 解析により各生育ステージにあるイネ根着生/内生菌相を解析したところ, イネ苗の根には全く存在しない *B. kururiensis* が圃場への移植後わずか 2 週間以内に根に定着し, 穂ばらみ期には細菌叢の約 16% を占めていた。また, 収穫後のイネ根残渣に残留し, 1 年経ても休眠状態で残存していた。

3)考察とまとめ トロポロン生成抑制化合物として 3 種類の PAA アナログを見出したが, これらは PAA アンタゴニストとして機能していると考えられる。一方, プロトカテク酸がトロポロン産生を亢進する現象を見出し, その亢進効果はフェニルアラニン無添加でも明瞭に認められた。従って, トロポロン生合成経路については再検討する余地がある。また, *B. kururiensis* は無施肥条件下では他者による抑制を受けず, 移植初期にイネ根ニッチを獲得し, 気道の広い LIA-1 と特に効率良く共生を成立させていると考えられた。イネ根残渣からイネ根への垂直伝播は, 貧栄養環境では極めて効率的と考えられ, *B. kururiensis* の生物肥料資材として有望性を示していた。