

平成22年 6月 4日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2006～2009
 課題番号： 18380031
 研究課題名(和文) 三型分泌機構「非」依存の植物病原細菌の研究
 研究課題名(英文) Studies on plant pathogenic bacteria not depending on the Type III Secretion System
 研究代表者
 瀧川 雄一 (TAKIKAWA YUICHI)
 静岡大学・農学部・教授
 研究者番号： 90163344

研究成果の概要(和文)： 植物病原細菌の主要な発病機構である III 型分泌機構は多くの細菌で見つかっているが、それによらない植物病原細菌の探索と新たな発病機構の解明を試みた所、*Pantoea ananatis* が該当することを見だし、系統により植物ホルモン合成遺伝子が主要な病原因子であることを解明し、それを利用した検出システムも構築した。また、イネ、ネギを侵す系統がタバコに過敏反応様の反応を引き起こすことも明らかにし、機能解析のための変異株の作出に成功した。*Rhizobacter dauci* や *Pseudomonas fuscovaginae* においても III 型非依存であることを示し、特異な発病機構の一端を解明した。

研究成果の概要(英文)： The Type III Secretion System (T3SS) is a well-known pathogenicity determinant among many plant pathogenic bacteria, though, it was demonstrated that some plant pathogens rely on their ability to induce disease other than T3SS. One of them, *Pantoea ananatis* were divided into three groups based on the pathogenicity on rice, onion and melon, the ability to induce HR-like reaction on tobacco, and presence of genes conferring plant hormone biosynthesis. Some transposon-tagged mutants were obtained for disabling induction of the HR-like reaction. *Rhizobacter dauci* and *Pseudomonas fuscovaginae* were also shown to be independent on T3SS, having new and specific pathogenicity determination systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	9,100,000	2,730,000	11,830,000

研究分野： 植物病理学

科研費の分科・細目： 農学・植物保護

キーワード： 植物病原細菌、III 型分泌機構、*hrp* 遺伝子、*iaa* 合成遺伝子、*Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*

1. 研究開始当初の背景

植物病原細菌の病原性因子転送機構としての三型分泌機構 (Type III secretion system: TTSS) が病原性発現において中心的な役割を果たし、多くの植物病原細菌においてその存在が確認されてきた。しかし、植物病原細菌は多様であり、TTSS の存在が検出できないあるいは一部欠損した種類もあることを、我々は予備的に察知してきた。研究の十分に進んだ *Agrobacterium* 属細菌は別として、他の細菌での病原性発現機構がすべて TTSS で説明されるのか、あるいは従来にない新たな病原性発現機構が存在するのかについてはなんら知られていない状況であった。

2. 研究の目的

TTSS によらずに病原性を発現している新たな発病システム系の存在を明らかにするとともに、関与する遺伝子やタンパクを明らかにし、従来の植物病原細菌とどこがどのように違っているかあるいはどこからが共通しているかを解明する。また、それらをマーカーにして病原系統と非病原系統を判別できる指標を開発して分類同定にも貢献する。

3. 研究の方法

(1) *Pseudomonas viridiflava* と *P. fuscovaginae* の *hrp* 遺伝子構造の解析と過敏感反応 (HR) 誘導因子の探索: *P. viridiflava* において T3SS である *hrp* 遺伝子の欠失の状況について PCR およびハイブリダイゼーションによって調査し、各種植物への接種試験からその機能との関連を調査した。また、*P. fuscovaginae* において、*hrp* 遺伝子や *pel* 遺伝子など病原性関連遺伝子の探索、および酵素活性の測定などを通じてその機能解析を行った。

(2) 新たな T3SS 非依存植物病原細菌の探索: 上記 2 種類以外の植物病原細菌で HR 誘導能力や強い病原性があるものの T3SS 機構に依存しない病原性システムを有する可能性のある病原体を探索するため、従来調査の及んでいない菌種についてサザンハイブリッドおよび PCR によってその存在を確認した。

(3) *Pantoea ananatis* における病原性発現因子の解明: 探索の結果新たに見つかった *P. ananatis* について病原性に関与する遺伝子を明らかにするとともに、その生態や発病機作を明らかにし、また植物体での反応過程を解析した。具体的には *iaa* 合成遺伝子の有無とそのシーケンスの調査を行い、また、トランスポゾンタギングによるタバコ HR 様反応の非誘導変異株の作出を試みた。さらに、タバコでの HR 様反応誘導時における特異的な遺伝子発現について RT-PCR により調査を行った。また、ネギ、イネ、メロンへの接種を行い、病原性の系統分化について調査

した。

4. 研究成果

(1) 当初主要なターゲットと考えていた *P. viridiflava* については、*hrp* 遺伝子の構造の異なる系統が存在し、一つは *P. syringae* と類似した *hrp* 遺伝子、もう一つには *hrp* 遺伝子が欠失していると推定したが、その部位は変形した *hrp* 遺伝子が入っており、基本的には従来型の T3SS 依存型の病原性発現機構に則っていることを明らかにした。よって本研究の主要なターゲットにはなり得ない事がわかった。

一方、タバコ HR 陽性である *P. fuscovaginae* については、調査した全ての系統で *hrp* 遺伝子の検出はできず、培養上清に HR 誘導能力を認めた。その壊死反応誘導能力とジャガイモ腐敗能力には強度と速さが異なる 2 系統があり、それらが同時に起こっていることを明らかにした。また、その腐敗能力が早く強い系統には、他の *Pseudomonas* と共通のペクチン分解酵素遺伝子 *pel* を保持していることを明らかにし、他方にはないことから、*P. fuscovaginae* のタバコ壊死反応誘導には未知のものを含む多種類のペクチン分解遺伝子が関与していることを明らかにした。また、近縁の *P. asplenii* との比較から、類似はしているが別種の細菌であることを明らかにした。

(2) T3SS に依存しない新たなタイプの病原体として、*Pantoea ananatis* と *Rhizobacter dauci* が浮上してきた。いずれも当研究室で近年解析を行っている細菌であり、前者はメロン果実内腐敗病を後者はニンジンこぶ病を引き起こす。いずれも T3SS は保有していないと推定された。*P. ananatis* はメロン果実内腐敗病の他、イネ内穎褐変病、パイナップル花樟病などの病原体として知られる他、広く植物体上の腐生細菌として存在することが知られている。これら *P. ananatis* の多くの菌株を収集し、さらに近縁の *Pantoea agglomerans* の病原性菌 (pv. *milletiae*, pv. *gypsophylae*) と腐生性菌を含め、比較調査を行った。*P. agglomerans* の病原性株はいずれも *hrp* 遺伝子を有しており、病原性への関与は既に証明されているが、前述のようにメロン分離細菌を含め *P. ananatis* では全くその存在を検出することができなかった。その一方で、メロン病原群はいずれも *iaaM*, *iaaH* および *etz* といった植物ホルモン合成遺伝子を保有しており、その有無と病原性が一致する事からこれらが主要病原因子である可能性を示した。*P. ananatis* で植物ホルモン合成遺伝子の存在が明らかになったのは本研究が世界に先駆けて示した成果である。このように *P. ananatis* では病原性分化が起こ

っている可能性が示された。

一方、*Rhizobacter dauci* については、ニンジン以外の多数種の植物の根にこぶ症状を形成していることを明らかにし、接種による再現も成功した。このことから、*R. dauci* が広い宿主範囲を有することを明らかにした。さらに、この研究の途中で、*R. dauci* が従来考えられていた γ -*Proteobacteria* ではなく、 β -*Proteobacteria* であることなど分類学的な位置づけを解明することができた。また、*R. dauci* が培養中に短時間で死滅しやすいという取扱い上の極めて不便な性質を有しているが、これは細菌の放出するヒドロキシ酪酸によって培地が急激に強酸性化することによるものであること、この急激な酸の放出が他の細菌で知られている abortive encystment と類似する現象であることをつきとめ、*R. dauci* が実は *Azotobacter* など知られるシスト様の構造を形成しており、その結果乾燥への耐久性が高まるなどの特異的な生態学的形質を有していることが明らかになってきた。このことは植物病原細菌では初めての発見であり、*R. dauci* の特異的な病徴発現と相まって新たな研究分野として大きく展開することが期待される。

(3) 上述のように、メロン果実内腐敗病菌である *P. ananatis* では植物ホルモン合成遺伝子やメロンに対する特異的な病原性のあることが明らかになったので、病原因子の主要候補として植物ホルモン合成遺伝子の関与について調査した。メロン果実腐敗病菌から PCR によって *iaaM*, *H. etz* を含む約 4 kb の領域をクローニングし、シークエンスを明らかにした所、約 92-96% と既知のカスミソウこぶ病菌のそれと高い相同性を示したが、一部欠失のある領域も見つかった。メロンから分離された多数の株のうち、5 株については、これら植物ホルモン合成遺伝子は PCR でもサザンハイブリでも検出されなかった。さらにそれらの病原性検定を行った結果、検出できなかった菌株は全てメロンに対する病原性が認められず、これらの遺伝子がメロンへの病徴発現に深く関与していることを明らかにした。さらにこの植物ホルモン合成遺伝子領域に欠失を導入してメロンへの病原性の関与について直接証明すべく、欠失クローンの作成を試みているが、現在までの所成功には至っていない。一方、この遺伝子領域を検出する PCR は、*P. ananatis* の選択培地と組み合わせることにより極めて敏感にメロン果実内腐敗病菌を検出できることがわかった。それにより、メロン栽培ハウス周辺において、栽培されているメロンの花、茎、種子など各植物体部位や、受粉用のミツバチ、花に生息するアザミウマ類などからの検出を試み、メロン雄花と雌花およびヒラズハナア

ザミウマから病原細菌を分離することに成功し、それらの病原性も確認できた。このことから本病が花器を通じて感染し、さらにヒラズハナアザミウマによって虫媒感染される可能性を示した。これによりアザミウマの防除などを含めた本病の防除対策を策定することが可能となった。

次に、*P. ananatis* の間で宿主範囲と病原性の分化が起こっていることが推察されたので、メロン、タバコ、ネギ、イネなどを中心に接種により宿主範囲を調査した。その結果、メロンに果実腐敗を引き起こすグループとイネやネギに病原性のあるグループ、その他のグループの 3 つのグループのいずれかに類別できることを明らかにし、それぞれ別の発病様態を示す事を解明した。この中でメロン病原群については上述したが、イネとネギに病原性のあるグループはタバコに過敏反応 (HR) 様の反応を示すことが明らかになった。このグループにはパイナップルの病原体も含まれ、予備的な試験からパイナップルへの病原性もこの系統に限られることが推定された。タバコでの HR 様反応は細菌を滅菌水に懸濁して注入した場合には出現せず、YP 培地等の液体培地で培養した培養液そのもの、あるいは細菌を YP 培地に再懸濁したものを注入した場合にのみ注入後 36 時間以降に出現し、なおかつ菌の濃度が 10 の 8 乗 cfu/ml 以上ないと出現しないなど、通常 *Pseudomonas syringae* などで見られる典型的な HR とは異なっていることが明らかとなった。*P. ananatis* については、同じ菌株でも HR 陽性と陰性という両方の報告があったが、それは、このような *P. ananatis* 独特の反応様式によるものであることを世界で初めて解明した。この反応が典型的な HR と同じ反応を含むかどうかを調査したところ、反応はシクロヘキシミドで阻害されることから植物細胞の動的なものであること、また、注入後にテトラサイクリンなどの抗生物質を再注入して細菌を死滅させるとやはり阻害されるが 4-6 時間後の注入では阻害がなくなることから、この間に誘導期が終了することを明らかにした。さらに、反応部位から HR に関与するといわれるタバコの *hin1* 遺伝子および *hrs203j* 遺伝子を RT-PCR で検出したところ典型的な HR より遅いものの 9 時間後ぐらいから明瞭な誘導が認められ、典型的な HR とは進行時間がやや遅いもののほぼ同様なプロセスが進行していることが明らかとなった。一方で、このイネ・ネギ病原群では *hrp* 遺伝子は検出できなかったため、このゆっくりとした HR 様の反応は新たな発病機構によって誘導されていることがさらに明確となった。

この発病機構を解明するために、培養上清などをタバコに注入したが、反応は見られず

毒素などの分泌物によるものではないことが示された。さらに、イネ病原株を用い、トランスポズンギングを行ってタバコでの反応を指標に変異株の作出を試みた。当初、この試験は短期に終了すると見込んでいたが、種々の問題点にあたって現在も推進中である。*P. ananatis* でのこのような変異株作出については従来の報告はなく、ようやく今回問題点が明らかとなってきた。一つはトランスポズン導入のための自殺ベクターが自殺されずに維持されてしまうという問題である。pSUP2021 と pWM173 を使用したが、いずれもプラスミドがそのまま維持されてしまい、トランスポズンの転移に成功しなかった。問題点の2つ目は *P. ananatis* 菌株の形質導入頻度の低さである。トランスポズンを直接導入する KAN-2 キットを用いて変異株を拾うことを試みたが、大腸菌等に比べ、2-3桁低い頻度でしか出現しなかった。その後、コンピテントセルの作成時にやや高温状態にすると頻度が上昇することから、細菌内に外部 DNA を切断するヌクレアーゼ活性があることが推定された。さらに、タバコでのスクリーニングの系において、トランスポズンの脱落を防ぐために YP 培地にカナマイシンを加えたもので培養してタバコに注入するという方式をとっていたが、変異株を 600 ほどスクリーニングしても全く反応陰性株が得られなかった。しかし、一度寒天培地状態で生育させた変異株を抗生物質なしの YP 培地に懸濁してタバコに打つように変更した所、100 ほどの株のなかからようやく 1 株だけ確実に陰性になった株を得ることに成功した。現在、さらに変異株を増やすとともに、この得られた株のトランスポズン挿入位置について解析を行っている最中である。

このように、本研究計画の範囲内では新規発病メカニズムを明確に提示するには至らなかったものの、多くの植物病理学的に意義のある知見が得られ、また、現在も継続している変異株調査から、あらたな発病遺伝子が取れてくることによって全貌が解明されることが大いに期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Kido, K., Hasegawa, M., Matsumoto, H., Kobayashi, M. and Takikawa, Y. (2010) *Pantoea ananatis* strains are differentiated into three groups based on reactions of tobacco and welsh onion and on genetic characteristics. J. Gen. Plant Pathol. 76: 208-218. 査読有

2) Kawarazaki, H., Goto, M., Kato, K., Kijima, T., Kawada, H., Yamamoto, K. and Takikawa, Y. (2009) Identification of the Bacterium Isolated from Galls Formed on Carrot and Weeds. J. Gen. Plant Pathol. 75: 235-240. 査読有

3) Kido, K., Adachi, R., Hasegawa, M., Yano, K., Hikichi, Y., Takeuchi, S., Atsuchi, T. and Takikawa, Y. (2008) Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 74:302-312. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1) 木戸一孝・古谷綾子・落合弘和・松本洋司・松本大雪・瀧川雄一 *Pantoea ananatis* Group 1 がタバコに誘導する過敏反応様反応 (HR-like reaction) の特徴 平成 22 年度日本植物病理学会 2010 年 4 月 20 日 京都市

2) 河原崎秀志・後藤正夫・木嶋利男・瀧川雄一 ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* のシスト様細胞形成 平成 22 年度日本植物病理学会 2010 年 4 月 19 日 京都市

3) 河原崎秀志・後藤正夫・田淵浩康・加藤孝太郎・木嶋利男・瀧川雄一 ニンジンこぶ病菌 *Rhizobacter dauci* が培養不能になる要因. 平成 21 年度日本植物病理学会 2009 年 3 月 26 日 山形県山形市

4) 木戸一孝・松本大雪・瀧川雄一 メロン果実内腐敗病菌の病原菌である *Pantoea ananatis* の感染・伝染経路に関する調査. 平成 21 年度日本植物病理学会 2009 年 3 月 26 日 山形県山形市

5) 松本大雪・木戸一孝・瀧川雄一 *Pantoea* 属細菌のイネ、タバコに対する病原性の調査. 平成 21 年度日本植物病理学会 2009 年 3 月 26 日 山形県山形市

6) Kido, K., Atsuchi, T. and Takikawa, Y. Pathogenicity of *Pantoea ananatis* causing internal fruit rot of netted melon. 第 9 回国際植物病理学会 2008 年 8 月 26 日 イタリア トリノ市

7) 河原崎秀志・後藤正夫・加藤孝太郎・木嶋利男・川田宏史・山本圭祐・瀧川雄一 ニンジンおよび自生植物から分離されたニン

ジンゴボ病菌の同定および分類学的位置について. 平成20年度日本植物病理学会
2008年4月27日 島根県松江市.

8) 木戸一孝・小林真樹・松本大雪・長谷川優・瀧川雄一 メロン果実腐敗病(仮称)の病原菌である *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) の宿主範囲と遺伝的特異性. 平成20年度日本植物病理学会 2008年4月27日 島根県松江市.

9) 木戸一孝・安達理恵・竹内繁治・曳地康史・瀧川雄一 メロン果実腐敗症から分離された *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) の病原性 平成19年度日本植物病理学会
2007年3月29日 栃木県宇都宮市

10) Takikawa, Y., Kotani, A. and Kameyama, Y. Diversity of *Pseudomonas viridiflava* based on *hrp* gene cluster. 第11回国際植物病原細菌学会 2006年7月13日 英国エジンバラ市

上記のうち、6) と10) は国際学会

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/b/plantpath/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧川 雄一 (TAKIKAWA YUICHI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 90163344

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし