チャ赤焼病細菌の菌体外多糖質産生および鞭毛が運動性、バイオフィーム形成、葉圏での生存および病原性に及ぼす影響

富濱 毅^{1*}・西 八東²・荒井 啓³

ABSTRACT

TOMIHAMA, T.^{1*}, NISHI, Y.² and ARAI, K.³ (2006). The effects of exopolysaccharide production and flagellum on motility, biofilm formation, survival and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. Jpn. J. Phytopathol. 72: 3–13.

In spontaneous and mutagen-induced mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *theae* for EPS production and/or flagellum, EPS production was correlated with the formation of a biofilm on an abiotic surface, formation of a bacterial aggregate and survival on nonwounded leaf surface, but was not required for virulence. The presence of a flagellum was correlated with swimming motility, biofilm formation on an abiotic surface, aggregate formation on the leaf surface, survival on a wounded leaf site and propagation within the leaf tissue. In addition, interactions between EPS production and flagellum were important for biofilm formation and survival on nonwounded leaf surfaces. A factor(s) other than EPS production and flagellum was required for swarming motility, and swarming motility and virulence were strongly correlated. These data indicate that EPS production is important for survival on nonwounded leaf surfaces, and the flagellum is needed for *P. syringae* pv. *theae* to survival on the wounded leaf and to propagate within the leaf tissue.

(Received June 17, 2005; Accepted September 5, 2005)

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *theae*, exopolysaccharide (EPS), flagellar motility, bacterial swarming, biofilm, survival on phyllosphere, virulence

緒 言

Pseudomonas syringae pv. *theae* (Hori 1915) Young, Dye & Wilkie 1978によるチャ赤焼病（以下、赤焼病）は、主に晩秋期から初春にかけての低温期に発生する病害で、特に霜・寒害発生年に多発することが報告されている（安藤, 1988）。また、茶園から分離される氷核活性細菌 *Xanthomonas campestris* (INAX) によって低温期に赤焼病の発生が助長されることが報告されており（富濱ら, 2006）、チャ葉に凍害を与えるような低温および INAX は本病発生要因の一つと考えられている。

このように赤焼病の発生に及ぼす環境要因の影響については明らかになりつつあるが、赤焼病細菌の葉圏での生存や病原性に関わる因子については、加藤らが赤焼病細菌からは毒素産生遺伝子は検出できず既知毒素産生も認められ

なかったと報告している（加藤・瀧川, 1997）のみで、不明な点が多い。赤焼病に対する効率的な防除法の確立のためには、病原細菌の生存や病原性などの発生生態を解明する必要がある。

植物病原細菌は植物の葉に定着し、細菌同士でバイオフィームとよばれる3次元の集合体を形成し、紫外線や乾燥、殺菌剤といったストレスから身を守ることが知られている（Lindow and Brandl, 2003）。バイオフィームとは一般に水系で形成され、数種類の菌が細胞間質によって包まれた集合体を形成したものであるが、近年植物の葉圏における細菌の存在形態として注目されている（Morris and Monier, 2003）。このバイオフィームの形成には、菌体外多糖質（EPS）および鞭毛が重要な働きをしていることが明らかになってきている（Davey and O'Toole, 2000）。

EPSについては、多くの植物病原細菌において葉での

¹ 鹿児島県茶業試験場（〒897-0303 鹿児島県川辺郡知覧町永里3964） Kagoshima Tea Experiment Station, 3964 Nagasato, Chiran-cho, Kawanabe-gun, Kagoshima, 897-0302, Japan

² 鹿児島県農業試験場（〒891-0116 鹿児島市上福元町5500） Kagoshima Agricultural Experiment Station, 5500 Kamisfukumoto-cho, Kagoshima-shi, 891-0116, Japan

³ 鹿児島大学農学部（〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24） Department of Agriculture, University of Kagoshima, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima-shi, 890-0065, Japan

* Corresponding author (E-mail: tomihama-tsuyoshi@pref.kagoshima.lg.jp)

生存に関与するとの報告があり、特に乾燥条件下での生存に関与するとされている (Beattie and Lindow, 1995). また、青枯病菌では、導管内で増殖した菌が産生する EPS によって萎凋症状が現れることから、EPS は病原性にも関与している (Saile *et al.*, 1997). 赤焼病細菌については、EPS の一種であるレバンの産生 (荒井ら, 1979) が認められているが、EPS がバイオフィーム形成や葉圏での生存、病原性に及ぼす影響については明らかでない。

また、鞭毛については、植物病原細菌が鞭毛によって葉の生存に適した場所 (気孔や細胞の接合部位の窪地) に移動することによって生存率が高まること (Beattie and Lindow, 1995) や、鞭毛が宿主での病原性および非宿主での過敏感反応に関与する (Ichinose *et al.*, 2003) など、鞭毛と葉圏での生存や病原性との関係も明らかにされつつある。さらに、赤焼病細菌は培地の寒天濃度によって2種類の運動性 (Swarm 型および Swim 型) を示すことが報告されているが (富濱ら, 2001)、鞭毛がこれらの運動性や、バイオフィーム形成、葉圏での生存、病原性に及ぼす影響については明らかでない。

そこで、赤焼病細菌の各種変異株を用いて、EPS 産生と鞭毛が運動性、バイオフィーム形成、葉圏での生存および病原性に及ぼす影響について調査した。

材料および方法

供試菌株 赤焼病細菌の野生型菌株として、1993年鹿児島県額姪町で発生した病葉から分離した K9301 株を用いた。また、K9301 株の自然突然変異株で透明なコロニータイプを示す K9301S, K9301S2, K9301S3 株、および K9301 株のニトロソグアニジン処理によって得られた K9301-4 株を供試した。

EPS 産生量の測定 供試菌株をキング B 寒天培地 (栄研社製) で48時間培養したコロニーを白金耳で釣菌し、250 μ l の滅菌水に懸濁した。これを 14,000 rpm で15分遠心して得られた上清液に、3倍量の95%冷エタノールを加え-30°C で一昼夜置いた後、14,000 rpm で15分遠心し、得られたペレットを95%エタノールで2回洗浄し、さらに遠心後得られたペレットを1 ml の滅菌水に懸濁したものを EPS 試料とした。試料中の全糖の定量はフェノール硫酸法 (Hodge *et al.*, 1962) で、タンパク質の定量はタンパクアッセイキット (Bio-Rad 社製) を用いて行ない、タンパク質量に対する全糖の比を EPS 産生量とした。試験は4反復で行った。

鞭毛着生状況および培地上での運動性 鞭毛は、供試菌株をキング B 液体培地で24時間培養した菌体につい

て、2%リンタングステン酸 (pH 7.0) によるネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行ない、各菌株10菌について鞭毛の着生数を調査し、平均鞭毛数を算出した。

また、培地上で運動性を観察する培地としてスクロースを炭素源とする最小培地である MAKCS 培地 (富濱ら, 2001) を用いた。約 10^7 cfu/ml ($OD_{620}=0.05$) に調整した供試菌株液を、Swim 培地 (0.28%寒天濃度の MAKCS 培地) もしくは Swarm 培地 (0.4%寒天濃度の MAKCS 培地) の中央に3 μ l 滴下した。滴下菌液の乾燥後、25°C でSwim 型は48時間後、Swarm 型は24時間後に培地上のコロニーの形態を観察するとともに、滴下部位からの広がりを目視で計測し運動性の指標とした。試験は2反復で行った。なお、Swarm 型の運動性の有無については、枝分かれしたコロニーの形成したものを Swarm 型の運動性有りと判断した。

細菌学的性質及び特異的 PCR 細菌学的性質については、アピ20NE キット (ピオメリュー社製) を用いた西山の方法 (西山, 1996) および後藤・瀧川の方法 (後藤・瀧川, 1984a, 1984b, 1984c) に従って行なった。また、赤焼病細菌に特異的な PCR には Pst-F ($5'$ AT-GAGAAGCTTTTGCTTTGCAC $3'$) および Pst-R ($5'$ ACA-TTCACGCACCCTTCAATCAGGA $3'$) プライマー (西ら, 1997) を用いた。PCR は、95°C で10分間熱変成させた後、5サイクル (熱変成 95°C, 30秒, アニーリング及び伸長反応 60°C, 2分), 続いて35サイクル (熱変成 95°C, 20秒, アニーリング及び伸長反応 60°C, 1分), さらに 72°C で10分間の伸長反応を1回行い、増幅される 297 bp のバンドの確認を行なった。

増殖程度およびウェル壁面でのバイオフィーム形成量の測定 約 10^5 cfu/ml の供試菌株を含む1%スクロース添加キング B 液体培地 100 μ l を96穴のマイクロタイタープレート (Nalgene 社製) のウェル内に注入し、25°C で24時間培養後、吸光度 ($OD_{620\text{nm}}$) を測定し、菌の増殖程度とした。

次に、バイオフィーム形成はこのマイクロタイタープレートの壁面に形成されるバイオフィームを測定する方法 (O'Toole and Kolter, 1998) を用いた。すなわち、上記の増殖程度を測定後、培養菌液を取り除き滅菌水で2回洗浄し、培養液面とウェルの壁面の境界に形成されたバイオフィームを、0.4%クリスタルバイオレットで染色した。染色されたバイオフィームからクリスタルバイオレットを95%エタノールで脱色し、吸光度 ($OD_{550\text{nm}}$) を測定し、この吸光度をバイオフィーム形成量とした。試験は4反復で行った。

葉圏での存在形態の観察 供試菌株および茶業試験場内の 'ゆたかみどり' から採取した成葉を供試した。約

10^7 cfu/ml の濃度 ($OD_{620}=0.05$) に調整した細菌懸濁液に成葉を浸漬後、 15°C 湿潤条件下で24時間置いた。その後、成葉を0.4%クリスタルバイオレットで30秒染色後、滅菌水で洗浄した。この成葉の裏面を超深度形状測定顕微鏡 (キーエンス社製, VK8510) で観察した。

葉圏での生存菌量 ‘ゆたかみどり’ 成葉を供試した。成葉の中肋に沿った葉身部を無傷もしくは針で付傷し、約 10^7 cfu/ml の濃度 ($OD_{620}=0.05$) に調整した細菌懸濁液に成葉を浸漬した。この成葉を湿潤条件下 ($\text{RH}=95\%$ 以上) に24時間おいた後、湿潤条件下もしくは乾燥条件下 ($\text{RH}=55\%$) に24時間おいた。その後、無傷および付傷した葉身を直径 10 mm のコルクボーラーで打ち抜き、500 μl の滅菌した0.01%の Tween20 を添加した0.9% NaCl 溶液を加え磨砕した後、1時間振とうした (150 rpm, 5°C)。この振とう液を、滅菌水を加えて 10^{-5} 倍まで段階的に希釈し、100 μl を PST-SM 選択培地 (荒井ら, 2002) で培養 (25°C) し、48時間後に出現した小型乳白色で目玉焼き状のコロニーを形成する細菌を赤焼病細菌として計数した。試験は各処理 4 反復で行った。

病原力の測定 ‘ゆたかみどり’ の成葉および茎を供試し、2種類の接種方法で病原力の測定を行なった。まず、葉を直径 10 mm のコルクボーラーで打ち抜いたリーフディスクを、約 10^7 cfu/ml の濃度 ($OD_{620}=0.05$) に調整した細菌懸濁液に10分間浸漬し、その後水で湿らせたろ紙を敷いたシャーレ内に置床し、 15°C 、12時間日長条件下で培養した。培養10日後に、各リーフディスクの病徴を、0 : 病徴なし、1 : わずかに病徴が見られる、2 : 50%程度が褐変している、3 : ほぼ全面が褐変している、の4段階で評価し、10枚のリーフディスクの平均を病徴指数とし病原力を判定した。試験は2反復で行った。また、接種6日後の組織内の病原細菌密度は、リーフディスクを15%過酸化

水素水で5分間表面殺菌した後 500 μl の滅菌水中で磨砕し、前述の方法によって赤焼病細菌を計数した。試験は3反復で行った。

第2の接種方法として、約 10^7 cfu/ml の濃度 ($OD_{620}=0.05$) に調整した細菌懸濁液を茎内に 5 μl 注入した後オアシスに茎を挿し、 15°C 、12時間日長条件下で培養した。培養14日後に、茎に現われた病斑の長径を測定し病原力を判定した。試験は4反復で行った。

結 果

変異株の分離

キング B 培地上で継代培養している際に野生型の K9301 株は、不透明 (Opaque) で粘性のあるコロニータイプから、ごくまれに透明 (Transparent) で粘性のないコロニータイプに変異した (以下 T 型変異, 第1図 A)。この T 型変異株はその後安定なものと、野生型のコロニータイプにまれに復帰するタイプがあり、安定的な T 型変異株として K9301S, K9301S2 および K9301S3 (第1図 B) を分離した。また、K9301 株をニトロログアニジンによって突然変異処理した後に得られた498菌株の中から、K9301 株より粘性の高い K9301-4 株 (第1図 B) を分離した。

鞭毛の着生状況および EPS 産生

野生型の K9301, T 型変異型の K9301S2 および K9301S3 株ではそれぞれ平均2.9本、2.7本および2.8本の極鞭毛がみられたが、T 型変異型の K9301S および K9301-4 では鞭毛がみられなかった (第1図 B, 第1表)。

K9301 株に比べて、粘性のない T 型変異株である K9301S, K9301S2 および K9301S3 株では EPS 産生量が著しく低かった (第1図 C, 第1表)。一方、K9301 株よりやや粘性の高い K9301-4 株は EPS 産生量が K9301 よりや

第1表 各種菌株の鞭毛数, EPS 産生量, 運動性, 接種後のディスク組織内の菌密度および病徴指数.

菌株	鞭毛数 ^{a)} (本)	EPS 産生量 ^{b)} (mg/mg protein)	運動性 (mm) ^{c)}		菌密度 ^{d)} (Log cfu+1/disk)	病徴指数 ^{e)}
			Swim 型	Swarm 型		
K9301	2.9	3.58	20.5	34.5	7.56	2.73
K9301S	0.0	0.08	1.5	1.3	5.63	0.13
K9301S2	2.7	0.26	21.0	3.3	7.19	0.60
K9301S3	2.8	0.23	21.0	37.0	7.50	2.70
K9301-4	0.0	4.95	4.0	14.0	5.03	0.13

a) 各菌株10菌の極鞭毛の平均, K9301S および K9301-4 では極鞭毛はみられなかった。

b) 第1図 C のデータ参照。

c) 培地中央に菌液滴下後, Swim 型は48時間, Swarm 型は24時間後のコロニーの広がり程度。

d) リーフディスク接種6日後に表面殺菌したディスク組織内の菌密度。

e) 各菌株10枚リーフディスクの病徴指数。

第1図 各種菌株の性状。(A) 不透明で粘性のある野生型のコロニータイプから透明で粘性のない株への変異の状況。(B) 各種菌株のコロニーの形態および鞭毛着生状況の電顕写真。コロニー写真のバーは5 mm、電顕写真のバーは1 μ mを、矢印は極鞭毛を示す。(C) 各種菌株のEPS産生量。異符号間には5%の危険率で有意差あり (Tukeyの検定)。(D) 培地上での野生型 K9301 株の Swim 型の運動性 (上のパネル) および Swarm 型の運動性 (下のパネル)。(E) 各種菌株の増殖程度とバイオフィーム形成程度。異符号間には5%の危険率で有意差あり (Tukeyの検定)。(F) 液体培地の境界のウェル壁面に形成されたバイオフィームを0.4%クリスタルバイオレットで染色した様子。左は野生型 K9301 株、右は T 型変異株 K9301S によって形成されたバイオフィーム。

や多かったが、有意差はなかった (第1図 C, 第1表)。

培地上での運動性

野生型の K9301 株は、MAKCS 培地で0.28%の寒天濃度では円形で Swim 型の、0.4%の寒天濃度では枝分かれした Swarm 型の運動性を示した (第1図 D)。鞭毛着生の K9301S2 および K9301S3 株は Swim 型の運動性を示したが、鞭毛非着生の K9301S および K9301-4 株では Swim 型の運動性はみられなかった (第1表)。また、K9301S3 株は Swarm 型の運動性を示したが、K9301S, K9301S2 および K9301-4 株では Swarm 型の運動性はみられなかった (第1表)。Swarm 型の運動性に関して、各種菌株の EPS 産生および鞭毛の着生状況 (K9301 は EPS⁺鞭毛⁺, K9301S は EPS⁻鞭毛⁻, K9301S2 は EPS⁻鞭毛⁺, K9301S3 は EPS⁻鞭毛⁺, K9301-4 は EPS⁺鞭毛⁻) が Swarm 型の運

動性に及ぼす影響について分散分析を行なった結果、EPS 産生および鞭毛着生とも Swarm 型の運動性と有意な関係はみられなかった (第2表)。

細菌学的性質及び特異的 PCR

調査した細菌学的性質の中で、ゼラチンの液化は K9301S, K9301S2, K9301S3 および K9301-4 の全ての変異株で陰性、レバンの産生は K9301S, K9301S2 および K9301S3 で陰性、タバコ過敏感反応は K9301-4 株でのみ陰性であった (第3表)。また、K9301S3 株ではマンニトールおよびソルビトールの利用が陰性であった。その他の10項目の細菌学的性質および47項目の炭水化物の利用性について、菌株間の違いはみられなかった (データ省略)。また、全ての菌株で PCR による赤焼病細菌特異的なバンドが確認された (第3表)。

第2表 EPS産生と鞭毛着生による Swarm 型の運動性およびバイオフィーム形成程度の分散分析

	要因	自由度	分散	分散比 ^{a)}	寄与率 (%)
Swarm 型の運動性	EPS (A)	1	260.4	1.31	2.7
	鞭毛 (B)	1	717.6	3.61	22.1
	A×B	1	177.6	0.89	7.6
	誤差	6	198.3		67.6
	全体	9			100.0
バイオフィーム形成	EPS (A)	1	0.189	362.4**	35.6
	鞭毛 (B)	1	0.092	176.1**	17.2
	A×B	1	0.241	461.8**	45.4
	誤差	16	5.2E-04		1.8
	全体	19			100.0

a)**は1%の危険率で有意.

第3表 各種菌株の細菌学的性質および特異的 PCR の結果

	K9301	K9301S	K9301S2	K9301S3	K9301-4
グラム反応	—	—	—	—	—
蛍光色素	+	+	+	+	+
極鞭毛	+	—	+	+	—
40°C 下での生育	—	—	—	—	—
オキシダーゼ	—	—	—	—	—
カタラーゼ	+	+	+	+	+
発酵性	O 型	O 型	O 型	O 型	O 型
硝酸還元	—	—	—	—	—
ゼラチンの液化	+	—	—	—	—
アルギニンの加水分解	—	—	—	—	—
レバンの産生	+	—	—	—	+
ジャガイモの腐敗	—	—	—	—	—
タバコ過敏反応	+	+	+	+	—
マンニトールの利用	+	+	+	—	+
ソルビトールの利用	+	+	+	—	+
PCR による増幅	+	+	+	+	+

増殖程度およびバイオフィーム形成程度

菌の増殖程度は、野生型の K9301 株に比べていずれの変異株も劣り、特に K9301S 株は低かった (第1図 E)。また、野生型の K9301 株はウェル壁面にバイオフィームを形成した (第1図 E) が、その他の変異株はほとんどバイオフィームを形成しなかった (第1図 F)。各種菌株の EPS 産生および鞭毛の着生状況がバイオフィーム形成に及ぼす影響について分散分析を行なった結果、バイオフィーム形成程度は EPS 非産生より EPS 産生で高く (寄与率35.6%)、鞭毛非着生より鞭毛着生で高く (寄与率17.2%)、EPS 産生と鞭毛着生の交互作用により高くなった (寄与率45.4%, 第2表)。

葉圏での存在状態

野生型の K9301 菌株は、接種24時間後には表皮細胞

の接合部の窪地や気孔周辺、毛茸基部の周辺に多数の細菌塊からなる立体的な集合体を形成していた (第2図)。K9301S では野生型で見られるような集合体の形成はみられず、表皮細胞の接合部位の窪地以外に単独で存在する場が多かった (第2図)。また、K9301S2、K9301S3 株および K9301-4 では野生株と同様に表皮細胞の接合部の窪地や気孔周辺、毛茸基部の周辺に集合体を形成していた (第2図)。

葉圏での生存菌量

各種菌株の生存菌量は、無傷部位において、EPS 非産生株である K9301S および K9301S3 は湿潤条件下より乾燥条件下で有意に生存菌量が低く、K9301S2 については湿潤条件下より乾燥条件下で生存菌量が低い傾向がみられた ($p=0.06$, 第4表)。有傷部位においては、K9301S 株のみ

第2図 各種菌株の葉圏での存在形態の超深度形状測定顕微鏡による写真。左の列は気孔周辺、右の列は毛茸基部周辺の写真。矢印は、表皮細胞接合部の窪みでの赤焼病細菌の集合体を示す。バーは20 μm を示す。

湿潤条件下より乾燥条件下で生存菌量が低い傾向がみられた ($p=0.09$, 第4表)。

生存菌量に関して、付傷の有無、湿度、各種菌株のEPS産生および鞭毛着生状況が生存菌量に及ぼす影響について分散分析を行なった結果、無傷部位での生存菌量は、乾燥条件下より湿潤条件下で高く(寄与率23.6%), EPS非産生よりEPS産生で高く(寄与率6.8%), 鞭毛着生と非着生では有意差はみられず、湿度とEPS産生(寄与率8.4%), およびEPS産生と鞭毛着生(寄与率13.1%)の交互作用により高くなった(第5表)。一方、有傷部位での生存菌

量は、湿潤条件下と乾燥条件下、およびEPS産生と非産生においても有意差はなく、鞭毛非着生より鞭毛着生で高かった(寄与率11.1%, 第5表)。

病原力および組織内での菌密度

リーフディスクへの接種法で、K9301株の接種10日後の病徴指数は2.85と高く、K9301SおよびK9301-4株は病徴指数がいずれも0.15と著しく低く、K9301S2株は0.60とK9301S株よりは高かったもののK9301株より低かった(第3図A, 第1表)。K9301S3株は病徴指数が2.75とK9301株と同程度の病徴指数であった(第1表)。これら

第4表 各種菌株の湿潤および乾燥条件下での生存菌量

菌株	付傷条件	生存菌量 (Log cfu+1/disk)		有意性 ^{a)}
		湿潤条件	乾燥条件	
K9301	無傷	5.04±0.75	4.79±0.82	n. s.
	有傷	4.80±1.26	5.11±0.58	n. s.
K9301S	無傷	4.91±0.48	2.82±0.93	**
	有傷	5.06±0.37	3.99±0.99	n. s.
K9301S2	無傷	4.24±0.65	3.45±0.31	n. s.
	有傷	5.27±0.56	4.62±1.34	n. s.
K9301S3	無傷	4.24±0.57	2.71±0.46	**
	有傷	4.92±0.62	4.97±0.50	n. s.
K9301-4	無傷	3.78±0.42	3.56±0.98	n. s.
	有傷	4.44±0.52	3.77±0.74	n. s.

a) 湿潤条件と乾燥条件の生存菌量間で, **は1%の危険率で有意差あり (t-test).

の傾向は、茎内に接種する方法を用いた場合も認められた (データ省略).

また、接種6日後の組織内の菌密度は、病徴指数の高かった K9301 および K9301S3 株では対数値で7.56および7.50と高く、病徴指数の低かった K9301S および K9301S2 株では5.63および5.03と低かった (第3図B, 第1表). 一方 K9301S2 に関しては、病徴指数は低いものの、組織内

の菌密度は対数値で7.19とほぼ野生型の K9301 株と同程度の菌密度であった (第1表).

各種菌株の鞭毛の着生と液体培地での増殖程度および組織内の菌密度とは有意に高い正の相関が見られ、Swarm型の運動性と病原力との間に有意に高い正の相関が見られたが、EPS産生と病原性との間に相関はみられなかった (第6表).

考 察

本報告では、赤焼病細菌の培地での運動性、バイオフィルム形成、葉圏での生存および病原性に及ぼす菌体外多糖質 (EPS) および鞭毛の影響について、変異株を用いて調査した.

今回分離した変異株について、K9301-4 株は変異原処理により分離したが、その他の変異株は、培養中に不透明で粘性のあるコロニーを形成する野生株から、透明で粘性のないコロニータイプに変異した自然突然変異株 (T型変異株) を用いた. このような変異は、EPS産生がみられず病原力の欠損を伴うことで青枯病菌などでよく知られており、その変異の機構が病原力制御遺伝子である *phcA* 遺伝子へのISの挿入や逆位のような遺伝的背景によることが最近明らかにされた (Poussier *et al.*, 2003). 赤焼病細菌のT型変異株も、変異株によってはまれに野生型のコロニー

第5表 無傷および有傷条件下において、湿度、各種菌株のEPS産生および鞭毛の着生状況による生存菌量の分散分析^{a)}

	要因	自由度	分散	分散比 ^{b)}	寄与率 (%)
無傷条件	湿度 (A)	1	9.52	20.87**	23.6
	EPS (B)	1	3.08	6.75**	6.8
	鞭毛 (C)	1	0.91	2.00	1.2
	A×B	1	3.68	8.08**	8.4
	A×C	1	0.21	0.47	0.0
	B×C	1	5.51	12.08**	13.1
	A×B×C	1	0.95	2.09	1.3
	誤差	32	0.45	0.38	45.6
	全体	39			100.0
有傷条件	湿度 (A)	1	1.64	2.58	3.5
	EPS (B)	1	0.71	1.12	0.3
	鞭毛 (C)	1	3.82	6.00*	11.1
	A×B	1	0.34	0.54	0.0
	A×C	1	1.42	2.23	2.7
	B×C	1	0.00	0.00	0.0
	A×B×C	1	0.29	0.46	1.2
	誤差	32	20.36	2.58	81.2
	全体	39	28.61		100.0

a) 第4表のデータをもとに多元配置分散分析を行った.

b) **は1%, *は5%の危険率で有意.

第3図 各種菌株の病原性と組織内菌密度. (A) 各種菌株のリーフディスク接種法による接種10日後の病徴. (B) 接種6日後の表面殺菌後のディスク組織内菌密度. 異符号間には5%の危険率で有意差あり (Tukeyの検定).

第6表 各種菌株の細菌学的性質の相関関係^{a)}

	EPS産生量	鞭毛数	Swarm型運動性	増殖程度	組織内菌密度
EPS産生量	1.00				
鞭毛数	-0.11	1.00			
Swarm型運動性	0.24	0.64	1.00		
増殖程度	-0.04	0.91*	0.60	1.00	
組織内菌密度	-0.36	0.96**	0.59	0.85	1.00
病原性	-0.01	0.83	0.93*	0.80	0.82

a) EPS産生量, 鞭毛数, Swarm型の運動性, 組織内菌密度および病原性は第1表のデータ, 増殖程度は第1図Eのデータを用いた. **は1%の危険率, *は5%の危険率で有意な相関.

タイプに復帰する場合があることから, 同様の機構による変異である可能性が考えられるが, 現在のところ遺伝学的な背景は不明である. 今回は, そのような野生型への復帰をしない安定的なT型変異株を用いた.

供試細菌の鞭毛の着生状況は, K9301SおよびK9301-4株で極鞭毛がみられなかったが, その他の野生型のK9301および変異株のK9301S2, K9301S3株では極鞭毛がみられた (第1図B). またEPS産生について, T型変異株のK9301S, K9301S2およびK9301S3株では野生型のK9301株に比べて著しく産生量が低かった (第1図C) が, これらは, EPS産生に関わる何らかの因子が変異したものと考えられる. 一方, K9301-4株については野生型のK9301株より培地上のコロニーは著しく粘性が増しており (第1図B), EPS産生量はK9301株よりやや多かったものの有意な差ではなかった (第1図C). この鞭毛を持たないK9301-4株の粘性が高まる現象は, コレラ菌O139株で鞭毛欠損株の全てでEPS産生が高まることでコロニーの形態が著しく皺状 (rugose) になり, 鞭毛がEPS産生量を調整するシグナルとして働いているとの報告 (Watnick *et al.*, 2001) と類似性があり興味深い, 今後詳細に検討す

る必要がある.

細菌は培地上のコロニーの形態によって6種類の運動性 (Swimming, Swarming, Gliding, Twitching, Darting, Sliding) を示すことが知られており, これらの運動性には鞭毛や繊毛, 細胞間シグナル伝達などが関与している (Eberl *et al.*, 1999). 赤焼病細菌の野生型のK9301株は, 培地の中央に菌を接種した場合, 培地の寒天濃度によって, きれいな円形のSwim型 (寒天濃度0.28%) と枝分かれしたSwarm型 (寒天濃度0.4%) のコロニーを形成する (第1図D). 細菌は, 水中や物体表面に厚い液層があるような場合にSwim型の運動性を用いて移動し, 物体表面の液層が薄い状態ではSwarm型の運動性を用いて移動すること, また, Swim型の運動性には鞭毛が関与することが報告されている (Rashid and Kornberg, 2000). 赤焼病細菌について, 鞭毛を持たないK9301SおよびK9301-4株ではSwim型の運動性を示さず, 鞭毛を持つK9301, K9301S2およびK9301S3株ではSwim型の運動性を示したことから, 赤焼病細菌のSwim型の運動性には鞭毛が関与していることが明らかとなった (第1表).

Swarm型の運動性は, 細菌が自由に動き回るSwim型の

運動性と異なり、細菌の形態の変化（鞭毛数の増加や細胞の長大化）を伴う組織化された運動で、鞭毛や菌密度感知機構（quorum sensing）などが関与することが知られている（Fraser and Hughes, 1999）。赤焼病細菌について、各種菌株のEPS産生と鞭毛の着生がSwarm型の運動性に及ぼす影響について分散分析を行なうと、EPS産生および鞭毛着生ともSwarm型の運動性には有意に関与しないことが明らかとなった（第2表）。Swarm型の運動性に鞭毛の関与が低いことは、鞭毛非着生株のK9301SとK9301-4株の混合によりSwarm型の運動性がみられること（データ未発表）からも支持されるが、これまでSwarm型の運動性に鞭毛は必須と考えられていた（Eberl *et al.*, 1999）ことから、興味深い現象である。以上の結果から、赤焼病細菌のSwarm型の運動性には、鞭毛やEPS産生以外の要因が関与していることが明らかとなった。

供試菌株のその他の細菌学的性質について、すべての変異株でゼラチンの液化が陰性で、プロテアーゼ活性が低いことが明らかとなった（第3表）。また、タバコ過敏反応がK9301-4株で陰性であった（第3表）。鞭毛の構成因子であるフラジェリンは、非宿主において過敏細胞死を誘導するエリシターとして働くことが知られており、鞭毛を介した運動性がみられなくてもフラジェリン産生のみで細胞死が誘導されることが明らかとなっている（Shimizu *et al.*, 2003）。鞭毛を持たないK9301S株とK9301-4株でタバコ過敏反応がそれぞれ陽性と陰性であることから、K9301S株は鞭毛をもたないがフラジェリンは産生している可能性が考えられる。

ウェルの壁面に形成されるバイオフィルムを測定する方法で、EPS産生と鞭毛による運動性がバイオフィルム形成に及ぼす影響について調査した。その結果、野生型のK9301株はバイオフィルムを形成したが、その他の変異株は野生株に比べてバイオフィルムの形成が著しく劣った（第1図E）。各種菌株のEPS産生と鞭毛の着生状況によってバイオフィルム形成量についての2元配置分散分析を行なうと、EPS産生（寄与率35.6%）および鞭毛着生（同17.2%）ともバイオフィルムの形成に関与し、それら以上にEPS産生と鞭毛着生との交互作用（同45.4%）がバイオフィルムの形成に関与することが明らかとなった（第2表）。緑膿菌や大腸菌などでは、ウェルを用いた同様の方法によってバイオフィルム形成量に及ぼすEPS産生と鞭毛の影響が調査されているが、鞭毛は細菌が表面に近接し微小コロニーを形成するのに必要で、EPSはその後バイオフィルムが成熟するのに必要とされており、いずれの形質の変異株でもバイオフィルム形成程度が減少すると報告

されている（Davey and O'Toole, 2000）。赤焼病細菌について、鞭毛着生とEPS産生のそれぞれの形質がバイオフィルム形成に関与し、さらにそれらの交互作用がバイオフィルム形成に重要な働きをしていることが明らかとなった。

各種菌株の葉圏での存在状況を、超深度形状測定顕微鏡を用いて観察すると、野生型のK9301株は接種24時間後には表皮細胞の接合部の窪地や気孔周辺、毛茸基部の周辺に多数の細菌塊からなる集合体を形成していた（第2図）。葉圏において、これらの部位は細菌が各種ストレスから身を守りやすい場所（protected sites）と考えられており（Beattie and Lindow, 1995）、赤焼病細菌も葉圏に傷がないような状態ではまずこれらの生存しやすい部位に集合体を形成して定着していることが明らかとなった。一方、変異株の中で、K9301Sでは野生型で見られるような集合体の形成はみられなかったが、K9301S2、K9301S3およびK9301-4では野生株と同様な集合体を形成していた（第2図）。K9301S株は、鞭毛およびEPS産生を欠くこと、K9301S2、K9301S3およびK9301-4株は鞭毛およびEPS産生のいずれかの形質を持つことから、鞭毛およびEPS産生のいずれかの形質で赤焼病細菌は葉圏で集合体を形成することが可能と考えられた。この結果は、先に述べたウェル表面におけるバイオフィルム形成に鞭毛着生とEPS産生の交互作用が強く関与する結果と若干異なったことから、ウェル表面のバイオフィルムと葉圏での集合体はやや異質であることが示唆された。これは、ウェルの表面と葉圏の表面との違いや、培養系と非培養系の違い、等が原因と考えられる。

葉圏における生存に及ぼすEPS産生の影響について、EPS非産生株のK9301S、K9301S2およびK9301S3では乾燥条件下で湿潤条件下より生存菌量が低かったことから、EPS産生が乾燥条件下での生存に関与することが明らかとなった（第4表）。先に述べた葉圏での供試菌株の存在状態と乾燥耐性との関係について、K9301S2およびK9301S3は葉圏で集合体を形成していたが、乾燥条件下での生存菌量は低かった。このことから、葉圏で集合体を形成するにはEPS産生もしくは鞭毛着生のいずれかが必要で、さらに乾燥耐性にはEPS産生が必要であることが明らかとなった。Monier and Lindow (2003) が葉圏において細菌が単独にいるよりも集合体にいる方が乾燥耐性が高まると報告しているが、今回の結果からは、集合体を形成するのみでは十分でなく、さらにEPS産生が乾燥耐性に必要なことが明らかとなった。

湿度条件、付傷の有無、各種菌株のEPS産生および鞭毛着生の各要因が生存菌量にどのような影響を及ぼすか調

査するため、多元配置分散分析を行なった。その結果、無傷部位において乾燥条件で生存菌量が低く、EPS産生によって生存菌量が高かったが、有傷部位においてはEPS産生によって生存菌量に影響はなかった(第5表)。EPSは細胞間質として細菌を取り囲むことで、乾燥から細菌を守ることが報告されているが(Yu *et al.*, 1999)、赤焼病細菌についても葉の無傷部位においてEPS産生によって乾燥耐性を獲得していることが明らかとなった。また、葉の有傷部位において、乾燥条件およびEPS産生とも生存菌量に影響はなく、有傷部位が乾燥しにくい部位で、赤焼病細菌が生存しやすい部位であることが示唆された。

一方、葉圏での生存に及ぼす鞭毛の影響については、無傷部位において鞭毛着生は生存菌量に影響はなく、有傷部位において鞭毛着生によって生存菌量が高かった(第5表)。青枯病菌では、鞭毛による運動性は組織内への侵入や定着に重要な働きをすることが報告されているが(Tans-Kersten *et al.*, 2001)、赤焼病細菌については鞭毛によって有傷部位で生存しやすいことから、有傷部位における鞭毛の重要性が示された。これは、葉圏で赤焼病細菌が有傷部位に定着するのに鞭毛による運動性を用いている可能性を示唆する。また、無傷部位において、鞭毛着生とEPS産生の交互作用で生存菌量が高く、その寄与率はEPS産生単独要因の寄与率より高かった(第5表)が、この結果は先に述べたバイオフィーム形成に鞭毛とEPS産生の交互作用の寄与率が高い結果(第2表)と一致したことから、バイオフィーム形成と同様に、葉圏の無傷部位での生存に鞭毛とEPS産生の交互作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

供試菌株の接種6日後の組織内での菌密度は、鞭毛を持たないK9301SおよびK9301-4株で有意に低く、組織内での増殖に鞭毛が関与することが明らかとなった(第1、第6表)。*P. syringae* pv. *tabaci*でも鞭毛欠損株は宿主内での増殖が劣り、低濃度で接種した場合は病原力が低いことが報告されている(Ichinose *et al.*, 2003)。赤焼病細菌の鞭毛非着生株でも同様の現象が確認されたが、その機構については明らかではない。一方、鞭毛を持つK9301S2株は、組織内での菌密度は野生株と同様であったが、病原力は低かった(第1、第6表、第3図)ことから、組織内での増殖に加えて何らかの要因が病原力に関与していると考えられた。

各種菌株の病原力はSwarm型の運動性と高い相関が見られたがEPS産生との相関はなかった(第1、第6表)。先に述べたように、Swarm型の運動性には、鞭毛およびEPS産生以外の何らかの要因が関与していることが明ら

かにされていることから、この要因が病原力に関与している可能性が考えられる。その他、赤焼病細菌がチャ葉の細胞間隙で増殖した後、組織内での病原細菌の広がりにはSwarm型の運動性が関与する可能性も考えられる。*P. syringae* pv. *syringae* B728a株では*gacS* (Willis *et al.*, 1990)や*gidA* (Kinscherf and Willis, 2002)、*ftsK* (Kinscherf and Willis, 2000)遺伝子の変異株は、病原性が低く、Swarm型の運動性を欠くことが報告されている。Swarm型の運動性は組織化された運動で、様々な要因が関与すると考えられ、今後は、菌株間の相補試験やコスミドを用いた遺伝子相補試験、発現遺伝子のサブトラクションなどによりSwarm型の運動性に関与する要因を解明し、それらの要因が病原力に及ぼす影響について明らかにする必要がある。

摘 要

赤焼病細菌の運動性やバイオフィーム形成、葉圏での生存、病原力に及ぼす菌体外多糖質(EPS)産生および鞭毛の影響について、突然変異株を用いて検討した。EPS産生はバイオフィーム形成、葉圏における細菌集合体の形成、無傷部位での乾燥耐性に関与したが、病原力に対する影響はなかった。鞭毛は、Swim型の運動性、バイオフィーム形成、葉圏における細菌集合体の形成、有傷部位での生存、組織内での増殖に関与した。さらに、EPSと鞭毛との交互作用が、バイオフィーム形成および無傷部位での生存に関与することが明らかとなった。Swarm型の運動性には、鞭毛およびEPS以外の要因が関与し、Swarm型の運動性と病原力との間には高い相関が見られた。以上の結果から、赤焼病細菌のEPS産生は主に葉圏の無傷部位における生存に、鞭毛は葉圏の有傷部位における生存および組織内での増殖に重要な役割を持つことが明らかとなった。

引用文献

- 荒井 啓・野中寿之・三木洋二・植原一雄(1979). 薩摩半島南部に発生した茶の細菌性病害について. 鹿大農学報 29: 55-61.
- 荒井 啓・迫田琢也・西 八東・岩井 久(2002). チャ赤焼病細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *theae* の分離用培地. 日植病報 68: 141-147.
- 安藤康雄(1988). 霜寒害年におけるチャ赤焼病の激発. 野茶試研報 B (金谷) 2: 41-45.
- Beattie, G.A. and Lindow, S.E. (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Ann. Rev. Phytopathol. 33: 145-172.
- Davey, M.E. and O'Toole, G.A. (2000). Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 847-867.

- Eberl, L., Molin, S. and Givskov, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. J. Bacteriol. 181: 1703–1712.
- Fraser, G.M. and Hughes C. (1999). Swarming motility. Curr. Opin. Microbiol. 2: 630–635.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984a). 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (2). 植物防疫 38: 385–389.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984b). 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (3). 植物防疫 38: 432–437.
- 後藤正夫・瀧川雄一 (1984c). 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方 (4). 植物防疫 38: 479–484.
- Hodge, J.E. and Hofreiter, B.T. (1962). Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol.1 (Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L. eds.) p. 388, Academic Press, New York.
- Ichinose, Y., Shimizu, R., Ikeda, Y., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaiharu, T., Inagaki, Y., Toyoda, K. and Shiraishi, T. (2003). Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: genetic analysis with flagella-deficient mutants *ΔfliC* and *ΔfliD* in host tobacco plants. J. Gen. Plant Pathol. 69: 244–249.
- 加藤光弘・瀧川雄一 (1997). 各種毒素生産遺伝子および氷核活性遺伝子の *Pseudomonas syringae* 群細菌における分布. 日植病報 63: 501 (講要).
- Kinscherf, T.G. and Willis, D.K. (2000). Transposon insertion in the *ftsK* gene impairs in plants growth and lesion-forming abilities in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 1263–1265.
- Kinscherf, T.G. and Willis, D.K. (2002). Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 184: 2281–2286.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. Applied Environ. Microbiol. 69: 1875–1883.
- Monier, J.M. and Lindow, S.E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 15977–15982.
- Morris, C.E. and Monier, J.-M. (2003). The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 429–453.
- 西 八束・澤田宏之・松田 泉・岩井 久・荒井 啓 (1997). PCR によるチャ赤焼病菌の検出. 日植病報 63: 481 (講要).
- 西山幸司 (1996). パソコンを用いた植物病原細菌同定システム「簡易同定96」の使い方. 農環研資 19: 1–24.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30: 295–304.
- Poussier, S., Thoquet, R., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M. and Trigalet, A. (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. Mol. Microbiol. 49: 991–1003.
- Rashid, M.H. and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 4885–4890.
- Saile, E., McGravey, J.A., Schell, M.A. and Denny, T.P. (1997). Role of Extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 87: 1264–1271.
- Shimizu, R., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaiharu, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2003). The *ΔfliD* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. Mol. Gen. Genom. 269: 21–30.
- Tans-Kersten, J., Huang, H. and Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J. Bacteriol. 182: 3597–3605.
- 富瀨 毅・西 八束・荒井 啓 (2001). チャ赤焼病菌とチャ樹から分離される氷核活性細菌との関係 (5) チャ赤焼病菌の培地上での運動性. 日植病報 67: 204 (講要).
- 富瀨 毅・西 八束・荒井 啓 (2006). チャ赤焼病の発生に及ぼす氷核活性細菌 *Xanthomonas campestris* の影響. 日植病報 72: 14–21.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L. and Kolter R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol. Microbiol. 39: 223–235.
- Willis, D.K., Hrabak, E.M., Rich, J.J., Barta, T.M., Lindow, S.E. and Panopoulos, N.J. (1990). Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 149–156.
- Yu, J., Penaloza-Vazquez, A., Charkrabarty, A.M. and Bender, C.L. (1999). Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Mol. Microbiol. 33: 712–720.