学会賞受賞者講演

植物病原細菌の分類および病原性毒素に関する研究*

西山 幸司**

Koushi NISHIYAMA**: Development of Rapid Methods for Identification of Phytopathogenic Bacteria and Clarification of Phytotoxin Production in Relation to Pathogenicity

植物病理学は着実に進歩し、科学と産業の発展に幅広く貢献している。特に、品質の高い作物を安定して生産する技術の開発において多大な貢献をしてきた。私は、細菌の側から作物の病害を観ることを主な任務とする研究室に長く所属してきたので、多くはその方向で思考してきた。また、現場からの問題提起に対応する課題も多く、今すぐには、求めるべき究極の姿とは何なのか等々について思いを巡らせてきた。そのような過程で辿り着いた手法は次のようなものである。まず、既存の技術を組み合わせて直面する問題の解決に当たる。そこで得た知識を拡張して、類似の問題を解決するための一般的な手法を導く。さらに、包括的で高度な問題解決法の策定に向けて、必要な基礎データを集積する。すなわち、「既存の機材と技術を駆使して当面の用を足すための橋を架け、その橋を利用し恩恵に浴しながら、必要な機材を収集あるいは開発して、より高機能な次の橋を架ける」という方法である。

本稿は、植物細菌病の診断と病原細菌の同定の過程で得られた成果、病害診断のための細菌同定法の開発とその関連技術の整備、および植物病原細菌の病原性の解明について行った一連の研究を概説するものである。特に、細菌の同定は多数の試験研究機関の方々との共同研究の結果であり、病原性毒素に関するものの多くは北海道大学との共同研究の結果である。終始ご指導ご支援を賜った関係各位に衷心より感謝申し上げる。

1. 植物病原細菌の分類に関する研究

植物病原細菌は植物に病原性を有する点で特徴があり、その分類は一般細菌と同様に細菌分類学のなかに位置づけられるが、農業との関わりを持たざるを得ない。古くは寄

生植物の違いを根拠として種の異同が論じられたが、今はその影もない。しかし、農業サイドからは、一貫して病原性を異にする細菌を識別する必要がある、特に近年の物流の発達で迅速な識別技術が求められるようになった。この要望に対しては菌種群に特異的な検出法の利用が有望であり、すでに一部の重要細菌病で抗血清等を用いる方法が実用化されている。ところが、特異的検出法は検査の対象とすべき細菌の種類が増大すると対応困難になるという弱点があるので、菌種群の種類を問わずすべての植物病原細菌を対象にできる識別あるいは同定技術の開発が必要である。また、検査に要する期間は短いに越したことはないが、同定精度の維持も考慮しなければならないので、当面の目安は植物検疫の慣例にならい、標本を得てから1週間以内に結果を出すことである。

分類学的研究においてはしばしば鶏と卵の関係が指摘される。分類を枠組みとして捉えるときは基準菌株 (type strain) を調査するだけでも可能であるが、同定を考慮に入れると種の境界についての情報が必要となる。菌種の変異の幅を知るためには菌株を網羅的に収集しなければならないが、菌株を多数集めるためには分類同定法が確立していなければならない。さらに、それらの菌株を使用する時まで安全に保存する技術も必要である。そこで、各所から依頼される病害の鑑定や病原細菌の同定に積極的に協力して菌株の収集を図り、当時我が国で唯一植物病原細菌を保存し、保存株目録を刊行していた農業技術研究所病理科の保存菌株に組み入れた。希望者には保存菌株を配布し、新規株の収集に協力していただいた。これらの連携によって集積される菌株を利用して、生産現場や植物検疫の場で利用するための細菌同定法の開発に着手した。

(1) 植物病原細菌の分類・同定

新しい作物や品種の導入あるいは栽培体系の変化に伴っ

* 平成 11 年 4 月 2 日 平成 11 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

** 農業環境技術研究所 National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba 305-8604, Japan

て、新病害が発生したり、従来目立たなかった病害が顕在化して大きな被害をもたらしたりする。細菌病の場合は、技術者層が薄いこともあって、各地の試験場や防除所等から病害の診断や病原の同定を依頼された。これらの要望に対して研究室をあげて取り組み、多数の菌株を得るとともに、新病害の発見や新知見を取りまとめて報告した。それらについて、原因細菌の報告時の学名を入れて例示すると、イネ苗立枯細菌病 (*Pseudomonas plantarii*)、イネ苗腐敗症 (*P. glumae*)、エンバクすじ枯細菌病 (*P. striafaciens*)、シコクビエ褐条病 (*P. alboprecipitans*)、ダイズ葉焼病 (*Xanthomonas campestris* pv. *glycines*)、ダイズ斑点細菌病 (*P. syringae* pv. *glycinea*)、コウゾ焼枯細菌病 (*P. syringae* pv. *broussonetiae*)、キャッサバ青枯病 (*P. solanacearum*)、トマト黒斑細菌病 (*P. viridiflava*)、ナス褐斑細菌病 (*P. cichorii*)、ニンジン斑点細菌病 (*X. carotae*)、ネギ葉枯細菌病 (*X. campestris* pv. *undetermined*)、ヤーコン萎凋細菌病 (*Erwinia chrysanthemi*)、チューリップ黒腐病 (*P. andropogonis*)、スターチス萎凋細菌病 (*P. caryophylli*)、ウメかいよう病 (*P. syringae* pv. *morsprunorum*)、マンゴーかいよう病 (*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*)、などである。このうち、*P. plantarii*、*P. syringae* pv. *broussonetiae* は新たに発見された病原細菌である。また、*P. andropogonis* と *P. woodsii* が同種異名の関係にあることもわかった。しかし、*P. avenae* (*P. alboprecipitans*, *P. setariae* を含む)、*P. cattleyae*, *P. rubrilineans* の分類 (現在主流の分類によると *Acidovorax avenae* の亜種を含む分類群) の問題、*P. syringae* pv. *maculicola* と *P. syringae* pv. *tomato* との異同等をはじめとして *P. syringae* の pathovar 分類の問題、*E. chrysanthemi* を pathovar で細分することの是非など、すでに異論が報告されているものも含め、新たに多数の問題点が発見された。これらの問題の多くは、冒頭に述べた生物としての細菌の分類に関わる問題と、国際貿易、農業政策や農業生産に関係する植物検疫・病害防除等の病害の原因としての細菌分類の問題とが入り乱れており、一朝一夕の解決は困難である。

細菌の学名は、国際細菌命名規約の改訂に伴って1980年を境に大きく整理され、その後も分類の進歩に合わせて変化している。そのため、明治以来積み重ねられてきた細菌病研究の系譜が辿りにくくなっている。この問題を解消するために、我が国に発生する植物病原細菌について学名の変遷を整理し、併せて細菌病の記載文献を整理し取りまとめた。

(2) 細菌の保存法

細菌の研究には菌株の保存が欠かせない。植物病原細菌は凍結乾燥法で保存されることが多い。この方法は長期間の安定保存には最適であるが、操作は煩雑であり、しかも、

頻繁に使用する菌株を毎回アンプルから出すというのは非効率である。一方、凍結保存法は簡単であるが、いったん解凍した後は再凍結して保存してはいけないとされていた。しかし、植物病原細菌は降霜・降雪地でも越冬するので、推定されているより耐凍性が高いのではないかと考え、凍結・融解を繰り返したところ、実用に耐える程度に生残することが判明した。また、保存温度は低いほど安定保存に好適であるが、取り扱いには厚手の手袋を必要とし設備費もかかる。ところが、庫内温度がさほど低くない家庭用冷凍冷蔵庫を用いても、数年間の保存に耐えることが実験的にわかったので、常に多数の株を扱う場合は、素手でさわれることと保存中の安定性を考慮して -40°C の冷凍庫が実用的である。

今日、微生物株は遺伝資源としても重視されるようになり、国家の生物資源、人類共通の生きている文化財、世代をまたぐ資産などと表されている。保存株は多数の type strain, pathotype strain のほか、我が国に発生する病原細菌の大多数を網羅している。これらは、以前は農業技術研究所病理科保存菌株として、現在は農林水産省微生物ジーンバンクとして、内外の希望者に配布されている。

(3) 簡易同定法の開発

一般に植物細菌病の発生は突発的で有効な薬剤も少ないために防除は困難であり、早期発見と原因細菌の特性に配慮した防除対策が必要とされる。ところが、1970年頃は植物病原細菌を迅速に同定する手法開発の黎明期で、蛍光色素産生 *Pseudomonas* 属植物病原細菌のための LOPAT 類別法 (Lelliott ら, 1966) と植物由来細菌の予備試験法 (Bradbury, 1970) がわずかに利用され始めていたにすぎない。そこで、精密同定法の検査手技によって得られる2~4日培養の途中結果を用いて、二分岐法で検索し同定する方法を案出し、9年間の試行を経て1978年に「簡易同定法の試案」として公表した。この方法はその後改良されているが、技術的にこれの延長線上にあるものを「簡易同定78」と称している。この同定法は、変異株や検査期間の短縮によって生じる問題は残るものの、同種内で多数を占める標準的な性質の菌群は正しく同定される特徴を持っている。その当時、医学細菌ではすでに変異の幅を考慮に入れた鑑別表を用いる方法が実用化されていた。その方法は同定結果の信頼度を評価する機能も持っているため、植物病原細菌に同様の方法を導入したいと思った。しかし、鑑別表のデータベースを作成するための元になる菌株がなかったので、菌株の収集から始め、併せて保存方法を改良した。

これらの準備ののち、細菌の性質の検査方法として、市販の細菌検査キット (アビ20NE) を利用する方法とマイクロプレート等を用いる西山処方による新規の方法とを採用してデータを集積し、主として本邦産の植物病原細菌を識別する2種類の鑑別表を作成した。次に、この鑑別表を用

いてパソコン上で検索する方法を開発し、「簡易同定 96」と名付けて公表した。この新簡易同定法は、検査の手技が簡単で検査期間は 2 日、同定候補菌種が可能性の高い順に表示される特徴を持っており、株当たりの検査費用は、市販のキットを用いる方法（簡易同定 96-API）が約 1000 円、西山処方もの（簡易同定 96-MUC）が約 50 円である。さらに、簡便・廉価を求める利用者向けに Web 版の検索方法も作出し、病害名リストとリンクさせて提供している。これらとは別に、多数の菌株を得ることが困難な本邦未発生細菌やまれに発生する細菌への対応策として、不特定多数の細菌学的性質を臨機応変に比較して同定候補菌種を絞り込む方法を開発し、簡易同定法の弱点を補っている。

以上のとおり、植物病原細菌の簡易で迅速な実用に供する同定法が完成した。今後は、さらに利便性を高めるために植物に常在する非病原細菌のデータを追加し、病原細菌か否かの判別をも容易にしたいと考えている。また、そのために集められる細菌は、生産環境を視野に入れた新たな病害防除法を開発する糸口を提供するものになろう、と密かな期待を持っている。

2. 病原性毒素に関する研究

農作物との関わりにおいては、細菌の分類は病原性の違いを反映することが望まれる。しかし、現行の手法では、病原性の違いに関わる本質的な因子が分類・同定のために調査される細菌の性質の中に含まれているのか否か疑問である。病原性の本体が判明すれば、病原性の違いを加味した菌種の識別が容易になるだけでなく、病害抵抗性作物の育種をはじめ作物生産へ計り知れない大きな貢献があるものと予想される。

一般には、病原性は侵略力と発病力に分けて考えられている。しかし 1970 年頃には、植物病原細菌ではこれを具体的に説明する事象は見出されていなかった。そこで、ライグラス類かさ枯病病斑からの分離細菌を用いて、細菌学的性質では違いがなく、病原性の有無で顕著に異なる菌株を比較し、病原性株のみにジャガイモ塊茎細胞を肥大させる作用のあることを発見した。共同研究者の協力を得て、本菌の培養液から原因物質を抽出・純化してその構造を決定し、コロナチンと命名した。コロナチンは、タブトキシン、ファゼオロトキシンに次いで 3 番目に構造決定された植物

病原細菌由来の毒素である。コロナチンは、罹病葉中に産生され、宿主と多数の非宿主植物に毒性を示し葉斑を形成した。本菌の他にコロナチン産生細菌を 2 種類発見した（現在は 8 種類が追加されている）。それらの宿主範囲は明らかに異なっており、病原細菌はおおの宿主植物組織内でのみ増殖した。また、かさ枯病斑由来の非病原性株は、組織内で増殖する能力を維持し、コロナチン産生能を喪失した細菌であることを、変異株を作出して立証した。

以上を総合すると、本菌の病原性は、植物組織内での増殖で感知できる侵略力と毒素コロナチンで表現される発病力とが順序だって発現することであると整理できる。すなわち、宿主以外の植物中では本菌は増殖できないので、コロナチンは産生されず、たとえその植物がコロナチン感受性であっても病斑が形成されることはない。この研究で得られた病原性発現の機序は、その他の細菌にも当てはまるものである。さらに、本菌のコロナチン産生能はプラスミドに支配されていることが明らかになった。これは毒素の産生がプラスミド上の遺伝子にコードされている最初の発見例である。これらの研究が礎となって、その後コロナチン関連の研究は、植物病理学、生化学、分子生物学の面で世界的に展開され、病原性に関することはもとより、化学構造と作用機構、コロナチン合成遺伝子等々で目ざましい成果が得られている。また最近の研究で、ダイズ斑点細菌病菌においては、コロナチン産生遺伝子は培地中ではいつでも発現するが、ジャガイモ塊茎切片や宿主の組織内ではその発現に植物由来の物質情報が関与していると推察される結果が得られている。これが一般的な現象であるなら、病原性関連遺伝子の研究においては、遺伝子の有無にとどまらず、細菌と植物とが接触する場での遺伝子の発現に留意する必要がある。

コロナチン非産生細菌が無病徴のまま組織内で増殖したことでもわかるとおり、侵略力と発病力とは別々の機構で発現している。今までは毒素や抵抗性について精力的に研究されてきたが、今後は植物組織内で病原細菌が増殖できるようになる条件の解明にも力を注ぐ必要がある。これは換言すれば病害感受性機構の解明である。この研究成果を逆手にとることによって、標的細菌から宿主と認知されない作物を育成する新たな育種目標が策定できると考えている。