学術奨励賞受賞者研究要旨

植物病原細菌の薬剤耐性機構に関する研究[†]

中 島 雅 己*

NAKAJIMA, M.*: Mechanisms of bactericide resistance in phytopathogenic bacteria

銅剤およびストレプトマイシン剤は細菌病に対する防除薬剤の中でも卓効を示すものとして、現在、世界各国で利用されている。しかし、近年、両薬剤の多用によってこれらに対する耐性菌の存在が顕在化し、両薬剤の防除効果の低下が大きな問題となっている。

耐性菌問題に対する新たな戦略を構築するためには耐性メカニズムの分子生物学的解析に関する基礎的知見を得ることが必要である。本研究では、キウイフルーツかいよう病菌の銅剤耐性およびストレプトマイシン剤耐性について解析を行った。

1. キウイフルーツかいよう病菌のストレプトマイシン耐性

1984年以降に静岡県内のキウイフルーツ園から分離された本菌の内、1987年以降の分離菌株の中にストレプトマイシン耐性菌の存在を確認した。さらに、本菌におけるプラスミドの検出を行い、耐性菌株は共通して約 70 kb のプラスミド (pPaCu1) あるいは約 280 kb のプラスミド (pPaCu2) を保持することを明らかにした。一方、感受性菌株からは何れのプラスミドも検出されなかった。これらの事実から、キウイフルーツかいよう病菌ではストレプトマイシン耐性遺伝子がこれら 2 種のプラスミド上に存在すると考え、pPaCu1 から耐性遺伝子の単離を試みた。pPaCu1 のコスミドライブラリーから、大腸菌において耐性を発現するクローンを選抜した後、耐性遺伝子を含む領域の制限酵素地図に基づいて耐性遺伝子を含む断片をサブクローニングした。この断片について、広宿主域プラスミド RSF1010 上に存在するアミノグリコシドリン酸転移酵素遺伝子との相同性の解析を行い、本菌におけるストレプ

トマイシン耐性機構がアミノグリコシドリン酸転移酵素による不活性化によるものであることを明らかにした。

2. キウイフルーツかいよう病菌の銅耐性

1. に供試した静岡県分離菌株の内、硫酸銅に対して耐性を示した菌株は全てストレプトマイシン耐性菌株と一致しており、両耐性遺伝子は同一プラスミド上に存在していることが考えられた。そこで、トランスポゾンタギングにより銅耐性に関与する領域をクローニングし、次いで、この領域をプローブにしてコスミドライブラリーより銅耐性遺伝子の全長を含むクローンを選抜した。得られたクローンについて銅耐性遺伝子の全領域の塩基配列を決定したところ、本遺伝子上には 10 個の ORF が存在することが明らかとなった。各々の ORF から予想されるアミノ酸配列の相同性検索から、6 個の推定アミノ酸配列は既に *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* で報告されている CopA, B, C, D, R および S と各々高い相同性を示した。また、他の 4 個ではアンチポーター型および ABC トランスポーター型の異物排出トランスポーターを構成するタンパク質との相同性が確認された。さらに、上記の異物排出トランスポーターの銅耐性への関与を調査するため、トランスポゾンを導入して変異プラスミドを作製し、キウイフルーツかいよう病菌を形質転換した。得られた形質転換株で銅感受性が上昇したことから、これらのトランスポーターも銅耐性に関与することが示唆された。以上のことから、本菌の銅耐性が 3 つの異なるシステムによって発現していることが明らかとなった。

本研究を行うにあたり、東京大学日比忠明教授、静岡大学後藤正夫名誉教授をはじめ多くの方々にご指導とご鞭撻を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

[†] 平成14年4月3日 平成14年度大会で受賞した学術奨励賞研究の要旨

* 茨城大学農学部 School of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki 300-0393, Japan