軟腐性 *Erwinia* 属細菌の病原性とペクチン質分解酵素†

露 無 慎 二

(静岡大学農学部)

1. はじめに

軟腐性 *Erwinia* 属細菌には, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *E. chrysanthemi* 等がある。これらの細菌が植物に感染すると、組織を崩壊すること(マセレーション)により軟腐症状を引き起こし、枯死せしめる場合もある。これら細菌の宿主範囲は広く、また発病はほ場ばかりでなく、収穫後の貯蔵、運搬中にも起こり、世界各国で大きな被害をもたらしている。本病害の主要な病徴である軟腐症状は、植物細胞壁中層を構成するゲル状物質(ペクチン質)が可溶化されることにより起こると考えられる。したがって、従前より、これらの細菌の病原性とペクチン質分解酵素活性との間には密接な関係があるものと考えられてきた。

2. ペクチン酸リアーゼの役割

ペクチン酸リアーゼ(E.C.4.2.2.2, PL)*は、脱エステル化したペクチン質(ペクチン酸)を最適基質とし、トランスエリミネーション機構により α -1,4結合を切断する酵素である。上記 *Erwinia* 細菌の感染によって軟腐症状を呈した病斑部には本酵素活性が検出される。また、これらの細菌の培養液より純化したPLを植物組織片に接種すると、マセレーションのみならず細胞死を引き起こす⁽¹⁾。これらのことから、PLが軟腐性細菌の主要な病原性因子であると考えられてきた。しかし、*Xanthomonas* 属細菌等のこれら以外の多くの植物病原細菌や⁽²⁾、*Pseudomonas fluorescens* や *Klebsiella* および *Yersinia* 属細菌等の非植物病原細菌もPLを生産する⁽³⁾。これらの軟腐性 *Erwinia* 以外の細菌のなかには、*in vitro* でジャガイモ塊茎等の植物組織片のマセレーシ

ョンを引き起こすものもあるが、ほ場では植物体に軟腐症状を呈するものは少ない。この理由として、(1)軟腐性 *Erwinia* 属細菌のPLと他の細菌のPLとの質的な違い、(2)PLの生産量の違い、(3)マセレーション補助因子⁽⁴⁾の違い、(4)植物体内における細菌の抵抗性回避機構の違い等が考えられる。

3. PLの生産誘導機構

軟腐性 *Erwinia* 属細菌による軟腐組織中のPL活性は、他の細菌による病斑部中のPL活性に比べはるかに高い。そこで、まず、PLの生産誘導機構について、subsp. *carotovora*, EC1株をモデル系に*in vitro*で調べてみた。その結果から、PLの基質(ペクチン酸)が分解されて初めて、PLの生産が誘導される(product induction)機構⁽⁵⁾と、このペクチン酸の代謝が活発になることにより、cAMPの濃度が下がり、転写が抑えられる(self-catabolite repression)機構⁽⁶⁾との相反する2つの機構のバランスによって、PLの生産が制御されていることを提唱した(図1)。その後、これらの機構が本グループ細菌に共通した制御機構であることが報告されている⁽⁷⁾。最近、これら細菌のPLが5~6個のpIを異にするアイソザイムからなることや、ペクチン酸分解産物のうち真の誘導物質が何であるのか、PL生産制御遺伝子としてどのようなものがあるか等が明らかにされてきているが⁽⁸⁾、これらについては、本号掲載の伊藤一敏氏のレビューを参照にされたい。このようにPL生産制御機構の詳細が明らかにされてきたが、他のPL生産菌における生産制御機構に関する研究結果が未だ乏しいので、両グループ細菌のPL生産誘導が質的に違うのか、量的に違うのかはまだわかっていない。

4. 細胞外分泌機構

PLの生産量を論じるとき、本酵素の基質は高分子であるため細菌細胞の外にあるであろうから、PLの細胞外分泌率が重要な意味を持つに違いない。*Erwinia* 属細菌は、大腸菌と同じ腸内細菌群に属し、多くの共通し

† Role of Pectic Enzymes in the Pathogenicity of Soft-Rotting *Erwinia*.

Shinji TSUYUMU (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Ootani, Shizuoka 422)

* 東北大学の研究グループではPALという名称をつけている。

図 1 ペクチン酸リナーゼの制御機構

細胞外で構成的に生産された PL と exo-PG によってペクチン酸が不飽和ジガラクトロン酸 (UDG) まで分野される。UDG は細胞内に取り込まれ代謝されるが、この中間産物が誘導物質 (I) となって *pel* 遺伝子の転写を促し、PL が生産、分泌される。PL による分解が進むと、UDG の代謝が活発になり cAMP の濃度が下がり、CAP を介しての RNA ポリメラーゼ (R) による転写が抑えられる。

た性状を持っている。しかし、大腸菌においては、すべての分泌性蛋白質が細胞外膜を通過できずにペリプラズムに集積するのに対し、*Erwinia* 属細菌においては、PL をはじめプロテアーゼ、セルラーゼ等の酵素が活発に細胞外に分泌される⁽⁹⁾。すなわち、*Erwinia* 属細菌は、グラム陰性細菌に特有な二重膜を持つが、細胞外膜をも通過させるなんらかの機構を持つと考えられる。筆者らの分離した、*Erwinia* 属細菌の PL アイソザイム (*E. chrysanthemi* の PLe に相当) の構造遺伝子とその制御部を含む 2014 bp からなる DNA 断片を持つ大腸菌クローンは、PL を活発に細胞外に分泌させ

る⁽¹⁰⁾。この構造遺伝子のシグナルペプチドのアミノ酸配列を図 2 に示したが、Inoue が指摘する大腸菌の分泌性蛋白質のシグナルペプチドのアミノ酸配列にみられる共通点⁽¹¹⁾ をすべて備えており、とくに特徴的な領域を持っているようでもない。したがって、この約 2 kb の DNA 断片上でシグナル部位以外の領域に外膜通過機構の秘密が隠されているはずである。最近、大腸菌が異種蛋白質を活発に細胞外に分泌するという例がいくつか紹介されている。こうした積極的に細胞外膜を通過させる機構としては、後にプロセッシングを受ける前駆体蛋白質の C 末端部が重要な役割を担う場合や⁽¹²⁾、大腸菌を leaky にする酵素活性が共存する場合等が報告されている。今後 site directed mutagenesis や遺伝子融合等によってこの機構が解明されれば、本グループ細菌の並外れた組織崩壊能力の謎が明確になってくるであろう。

5. PL 以外のマセレーション酵素

E. chrysanthemi, EC 16 株は四つの PL アイソザイムを生産する。これらの遺伝子をすべて marker exchange により欠失させても、野生型の 2~21% 程度であるがジャガイモ塊茎に対する病原性があり、ニンジン等の植物組織片を崩壊させる能力も弱いながらも残っていることが報告されている⁽¹³⁾。このことは、PL 以外にも組織崩壊させる酵素を EC 16 株が分泌していることになる。植物体内のペクチン質は部分的にエステル化されており (ペクチンとよばれる)、PL 単独の作用では、エステル化されたポリマー部およびこれに隣接する部分が分解を受けずに残るはずである。したがって、このメチルエステルを脱エステルするペクチンメチルエステラーゼ (*E. C. 3.1.1.11*, PME) や、エステル化されたペク

* 353

412*

ATG.AAA.AAC.ACG.CGT.GTA.CGT.TCT.ATC.GGA.ACT.AAA.AGT.TTA.CTG.GCT.GCC.GTT.GTA.ACA
Met-Lys-Asn-Thr-Arg-Val-Arg-Ser-Ile-Gly-Thr-Lys-Ser-Leu-Leu-Ala-Ala-Val-Val-Thr

* 413

GCA.GCA.CTG.ATG.GCT.ACC.TCT.GCT.TAT.GCG.GCA.
Ala-Ala-Leu-Met-Ala-Thr-Ser-Ala-Tyr-Ala-Ala-

図 2 PLe アイソザイムのシグナルペプチド

上段は DNA 塩基, 下段はアミノ酸配列。矢印の所でプロセッシングを受ける。

チン質をトランスエリミネーション機構で切断するペクチンリアーゼ (E. C. 4. 2. 2. 10., PNL) が共存していなければ、植物体内のペクチン質を有効に低分子化できないであろう。ペクチン質の低分子化が不十分であるということは、病原細菌はペクチン質を自身の栄養源として利用しにくいということでもあるし、product induction による PL の生産誘導も不十分であろう。

本グループ細菌が PNL を生産することは、その異常な誘導機構のために長らく知られていなかった。すなわち、PNL の生産誘導はあたかも SOS 反応のごとく、マイトマイシンC、ナリジキシル酸等の DNA 損傷物質の添加によって起こる⁽¹⁴⁾。その後、これらの条件下の調査から、本グループ細菌のほとんどが PNL を生産することが判明している⁽¹⁵⁾。さらに、本グループ細菌を植物組織片に接種すると、植物体内の DNA 損傷物質 (ラジカル生成) によって PNL が生産誘導を受けることが示されている⁽¹⁶⁾。また、ペクチンを基質としたアッセイでは、PL や PAL を混合して作用させると、単独で作用させたときにある分解の限界がなくなることも確認されている⁽¹⁷⁾。したがって、軟腐性 *Erwinia* 属細菌では、PL と少なくとも PNL とが併せて分泌されることにより、植物間隙にあるペクチン質が効率よく低分子化されているのであろう。そうであるとすれば、図3に示したような、植物側と本グループ細菌側の両方に、両酵素の生産や活性に影響を及ぼす種々要因が存在しており、これらの組み合わせが感染成立の決定に影響を及ぼすものと考えられる。

6. その他の病原性因子

植物病原細菌の感染過程は、気孔、傷等の開口部からの侵入に始まり、病原細菌と宿主植物との間の特異的認識反応を経て、親和性病原細菌のみが宿主の抵抗性反応をまぬがれ、増殖を許された後、発病因子を生産して病徴を表す。この感染過程のなかで病原細菌が具備してい

なければならない因子をすべて病原性因子と呼ばなければならないと筆者は考えている。近年、各種植物病原細菌でトランスポゾンを使って非病原性突然変異株が数多く分離され、この広義の (いわば架空であった) 病原性因子の遺伝子が単離され、それらの DNA 塩基配列も明らかにされてきている⁽¹⁸⁾。さらにトランスポジションの際、活性測定の容易な酵素の遺伝子を融合できるようにしておいて、これらの病原性因子の生産制御機構も明らかにされてきている。軟腐性 *Erwinia* 属細菌の場合も、発病因子であるペクチン質分解酵素以外の病原性因子が捉えられてきている。PL 遺伝子の大腸菌クローンを Massive に植物組織片に接種して、軟腐症状を再現できるからといって、PL のみで病原性が説明できるわけではない。本グループ細菌の場合に限らず、病原性を動的に捉えるためには、今後植物の抵抗性反応の存在する自然発病に近い系で、多くの病原性因子を把握しながら研究を行っていく必要がある。

図3 *Erwinia* 軟腐性属細菌の発病に影響を及ぼす要因

- (1) H. G. Basham and D. F. Bateman : *Phytopathology*, **65**, 141 (1975).
- (2) M. P. Starr and S. Nasuno : *J. Gen. Microbiol.*, **46**, 425 (1967).
- (3) M. P. Starr, A. K. Chatterjee, P. B. Starr and G. E. Buchanan : *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 379 (1977).
- (4) S. Ishii and K. Kiho : *Phytopathology*, **66**, 1077 (1976).
- (5) S. Tsuyumu : *Nature*, **269**, 237 (1977).
- (6) S. Tsuyumu : *J. Bacteriol.*, **137**, 1035 (1979).
- (7) A. Collmer and N. T. Keen : *Annu. Rev. Phytopathol.*, **24**, 383 (1986).
- (8) A. Kotoujansky : *Annu. Rev. Phytopathol.*, **23**, 297 (1987).
- (9) T. Andro, J. Chambost, A. Kotoujansky, J. Cattaneo, Y. Bertheau, F. Barras, F. Gijsegem and A. Coleno : *J. Bacteriol.*, **160**, 1199 (1984).
- (10) S. Tsuyumu and Y. Miyamoto : *Symbiosis*, **2**, 103 (1986).
- (11) M. Inouye, S. Inouye, S. Pollitt, J. Ghayeb and C. A. Lunn : "Protein Transport and Secretion," ed. by M. Gething, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1985, p. 54.
- (12) N. Yanagida, T. Uozumi and T. Beppu : *J. Bacteriol.*, **166**, 937 (1986).
- (13) J. L. Ried and A. Collmer : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**, 32 (1988).
- (14) S. Kamimiya, Y. Itoh, K. Izaki and H. Takahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 975 (1977).
- (15) S. Tsuyumu and A. K. Chatterjee : *Physiol.*

- Plant Pathol.*, **24**, 291 (1984).
- (16) S. Tsuyumu, T. Funakubo, K. Hori, Y. Takikawa and M. Goto : *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, **51**, 294 (1985).
- (17) S. Tsuyumu and M. Ohiwa : Abstr. Fallen Leaf Lake Conf. on *Erwinia*, 1987, p. 7.
- (18) D. Mills : *Annu. Rev. Phytopathol.*, **23**, 297 (1985).
-