

氏名(本国籍)	塩谷 浩 (島根県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第122号
学位授与年月日	平成19年9月12日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	カンキツかいよう病菌における細菌学的性質と非病原力/病原力遺伝子に関する研究
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 百町 満朗 副査 静岡大学 教授 露 無 慎二 副査 岐阜大学 教授 小山 博之 副査 信州大学 准教授 久我 ゆかり

論文の内容の要旨

カンキツかいよう病はカンキツかいよう病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* によって引き起こされる世界的にも重要なカンキツ病害のひとつである。カンキツかいよう病菌は広い宿主範囲を持ち、全てのカンキツ属とカラタチ属を含むミカン科植物に感染するが、各植物の間では感受性が異なる。南アメリカ諸国では、カンキツにかいよう症状を引き起こすがカンキツかいよう病菌とは系統発生的に異なる病原型 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* が確認されている。わが国で分離されるカンキツかいよう病の病原細菌は、血清学的性質、*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* を特異的に検出する PCR 法及び本細菌の *hrp* 遺伝子群をプローブとしたハイブリダイゼーションにより、全て *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* と同定された。

日本産カンキツかいよう病菌では既報のとおり、本細菌のファージ Cp1 と Cp2 に対する感受性がそれぞれ異なる4つの系統が存在した。Cp1 に感受性の細菌株のみがマンニトールを単独の炭素源として利用できた。また、Cp2 に感受性の株はウンシュウミカンから優勢に分離された。

カンキツかいよう病菌の細菌株間における病原力の違いを調べるため、ネーブルオレンジ、グレープフルーツ、ウンシュウミカン、メキシカンライム、ユズ、タチバナ及びブタン類の3品種(‘大橘’、‘晚白柚’及び‘安政柑’)を用いて付傷接種法により評価した。その結果、カンキツかいよう病菌はブタン類に対する病原力の違いに基づき、2つの系統に分化していることが判明した。また、ブタンに対して病原力が異なる系統間ではファージ感受性が異なった。すなわち、Cp1 に感受性で Cp2 に抵抗性の細菌株は弱い病原力を、一方、Cp1 に抵抗性で Cp2 に感受性の株は標準的な病原力を示す傾向が認められた。さらに、病原力が異なる系統は ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) 配列をプライマーとした rep-PCR により識別可能で、標準病原力系統でのみ 1.8-kb の DNA 断片が特異的に増幅された。この 1.8-kb DNA 配列が存在するゲノム領域を調べた結果、標準病原力系統では 1.8-kb 配列近傍に可動遺伝因子でありファージ由来のインテグラーゼと思しき遺伝子が存在した。一方、弱病原力系統では本遺伝子が欠損していた。この結果は本細菌の病原力分化にファージが関与している可能性を示唆した。

avrBs3/pthA ホモログのうち、幾つかの遺伝子は *Xanthomonas* 属植物病原細菌の病原力発現に劇的な効果を発揮する。そのような遺伝子の中でもカンキツかいよう病菌の病原力遺伝子 *pthA* はカンキツに対する完全な病原力発現に決定的な役割を果たす。本細菌 KC21 株から見出された

病徴発現に必須な遺伝子 *pthA-KC21* は中央部反復領域において、その構成単位の数及び配置が *apl1* 及び *pthA* と極めてよく似ていた。この結果はカンキツに完全な病原力を発現するためには *avrBs3/pthA* 遺伝子翻訳タンパク質が適切な構造をとる必要があることを示唆した。

カンキツかいよう病菌の弱病原力系統 KC21 株を用いたトランスポゾンタギング実験により、ブンタン類に対して標準的な病原力を示す突然変異株 KC21T46 株が得られた。トランスポゾンの挿入により不活化された遺伝子 *hssB3.0* はブンタン類に対する病原力発現を特異的に抑制した。本遺伝子は同じく KC21 株に存在する *avrBs3/pthA* ホモログの *pB3.1* と *pB3.7* 間の組換えによって生じたと思われるキメラ遺伝子であった。*hssB3.0* は調査した全ての弱病原力系統の細菌株に存在したが標準病原力系統の株では認められなかった。本遺伝子はブンタン類に抵抗反応を引き起こす。しかし、*hssB3.0* は *pthA-KC21* によって引き起こされるかいよう症状の進展を完全に妨げることができない。非病原力遺伝子は通常、宿主植物における過敏感反応を誘導するため、感染が停止して病徴がさらに進展することはない。この観点から *hssB3.0* を非病原力遺伝子とみなすことは困難である。

核ゲノムと細胞質ゲノムがそれぞれネーブルオレンジとウンシュウミカンに由来するカンキツ細胞質雑種（サイブリッド）のカンキツかいよう病菌に対する感受性を調べた。サイブリッドにおける細菌増殖と病斑の大きさは核ゲノム親のネーブルオレンジと同等でありウンシュウミカンに勝っていた。圃場における発病程度も同様な傾向を示したことから、宿主の核ゲノムこそがカンキツかいよう病に対する感受性に決定的な役割を果たすと考えられた。しかし、ネーブルオレンジとウンシュウミカンの間では、病原力遺伝子 *pthA-KC21* が破壊された突然変異株 KC21T14 の接種でも細菌増殖ならびに病斑の大きさに有意な違いが認められた。したがって、ウンシュウミカンとネーブルオレンジ間の感受性の違いに病原力遺伝子 *pthA-KC21* は関与していないと考えられた。しかし、KC21T14 株の接種でもサイブリッドの本株に対する感受性がウンシュウミカンではなくネーブルオレンジと同等であったことから、病原力遺伝子の有無に関わらず、核ゲノムがカンキツかいよう病菌に対する感受性を支配していると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席者のもと、平成 19 年 8 月 7 日（火）午後 4 時 30 分より岐阜大学連合大学院棟 6 F 会議室において実施された。

カンキツかいよう病はカンキツかいよう病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* によって引き起こされる世界的にも重要なカンキツ病害のひとつである。カンキツかいよう病菌は広い宿主範囲を持ち、全てのカンキツ属とカラタチ属を含むミカン科植物に感染するが、各植物の間では感受性が異なる。南アメリカ諸国では、カンキツにかいよう症状を引き起こすがカンキツかいよう病菌とは系統発生的に異なる病原型 *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* が確認されている。わが国で分離されるカンキツかいよう病の病原細菌は、血清学的性質、*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* を特異的に検出する PCR 法及び本細菌の *hrp* 遺伝子群をプローブとしたハイブリダイゼーションにより、全て *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* と同定された。

日本産カンキツかいよう病菌では既報のとおり、本細菌のファージ Cp1 と Cp2 に対する感受性がそれぞれ異なる 4 つの系統が存在した。Cp1 に感受性の細菌株のみがマンニトールを単独の炭素源として利用できた。また、Cp2 に感受性の株はウンシュウミカンから優勢に分離された。

カンキツかいよう病菌の細菌株間における病原力の違いを調べるため、ネーブルオレンジ、グレープフルーツ、ウンシュウミカン、メキシカンライム、ユズ、タチバナ及びブンタン類の 3 品種（‘大橘’、‘晩白柚’及び‘安政柑’）を用いて付傷接種法により評価した。その結果、

カンキツかいよう病菌はブント類に対する病原力の違いに基づき、2つの系統に分化していることが判明した。また、ブント類に対して病原力が異なる系統間ではファージ感受性が異なった。すなわち、Cp1に感受性でCp2に抵抗性の細菌株は弱い病原力を、一方、Cp1に抵抗性でCp2に感受性の株は標準的な病原力を示す傾向が認められた。さらに、病原力が異なる系統はERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) 配列をプライマーとしたrep-PCRにより識別可能で、標準病原力系統でのみ1.8-kbのDNA断片が特異的に増幅された。この1.8-kb DNA配列が存在するゲノム領域を調べた結果、標準病原力系統では1.8-kb配列近傍に可動遺伝子でありファージ由来のインテグラーゼと思しき遺伝子が存在した。一方、弱病原力系統では本遺伝子が欠損していた。この結果は本細菌の病原力分化にファージが関与している可能性を示唆した。

avrBs3/pthA ホモログのうち、幾つかの遺伝子は *Xanthomonas* 属植物病原細菌の病原力発現に劇的な効果を発揮する。そのような遺伝子の中でもカンキツかいよう病菌の病原力遺伝子 *pthA* はカンキツに対する完全な病原力発現に決定的な役割を果たす。本細菌 KC21 株から見出された病徴発現に必須な遺伝子 *pthA-KC21* は中央部反復領域において、その構成単位の数及び配置が *apl1* 及び *pthA* と極めてよく似ていた。この結果はカンキツに完全な病原力を発現するためには *avrBs3/pthA* 遺伝子翻訳タンパク質が適切な構造をとる必要があることを示唆した。

カンキツかいよう病菌の弱病原力系統 KC21 株を用いたトランスポゾンタギング実験により、ブント類に対して標準的な病原力を示す突然変異株 KC21T46 株が得られた。トランスポゾンの挿入により不活化された遺伝子 *hssB3.0* はブント類に対する病原力発現を特異的に抑制した。本遺伝子は同じく KC21 株に存在する *avrBs3/pthA* ホモログの *pB3.1* と *pB3.7* 間の組換えによって生じたと思われるキメラ遺伝子であった。*hssB3.0* は調査した全ての弱病原力系統の細菌株に存在したが標準病原力系統の株では認められなかった。本遺伝子はブント類に抵抗反応を引き起こす。しかし、*hssB3.0* は *pthA-KC21* によって引き起こされるかいよう症状の進展を完全に妨げることができない。非病原力遺伝子は通常、宿主植物における過敏反応を誘導するため、感染が停止して病徴がさらに進展することはない。この観点から *hssB3.0* を非病原力遺伝子とみなすことは困難である。

核ゲノムと細胞質ゲノムがそれぞれネーブルオレンジとウンシュウミカンに由来するカンキツ細胞質雑種 (サイブリッド) のカンキツかいよう病菌に対する感受性を調べた。サイブリッドにおける細菌増殖と病斑の大きさは核ゲノム親のネーブルオレンジと同等でありウンシュウミカンに勝っていた。圃場における発病程度も同様な傾向を示したことから、宿主の核ゲノムこそがカンキツかいよう病に対する感受性に決定的な役割を果たすと考えられた。しかし、ネーブルオレンジとウンシュウミカンの間では、病原力遺伝子 *pthA-KC21* が破壊された突然変異株 KC21T14 の接種でも細菌増殖ならびに病斑の大きさに有意な違いが認められた。したがって、ウンシュウミカンとネーブルオレンジ間の感受性の違いに病原力遺伝子 *pthA-KC21* は関与していないと考えられた。しかし、KC21T14 株の接種でもサイブリッドの本株に対する感受性がウンシュウミカンではなくネーブルオレンジと同等であったことから、病原力遺伝子の有無に関わらず、核ゲノムがカンキツかいよう病菌に対する感受性を支配していると考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

【基礎となる学術論文】

1. Hiroshi Shiotani and Takashi Tsuge (1995). Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Molecular and General Genetics* 248, 142-150.

2. Hiroshi Shiotani, Katsumi Ozaki and Shinji Tsuyumu (2000). Pathogenic interactions between *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and cultivars of pummel (*Citrus grandis*). *Phytopathology* 90, 1383-1389.
3. Hiroshi Shiotani, Takashi Fujikawa, Hiromichi Ishihara, Shinji Tsuyumu and Katsumi Ozaki (2007). A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *Journal of Bacteriology* 189, 3271-3279.

【既発表学術論文】

1. 佐藤豊三、塩谷浩、植松清次、小林正伸、中村靖弘(1994). *Puccinia arenariae* によるジブシー系カーネーション黒さび病の初発生. *日本植物病理学会報* 60, 535-539.
2. 塩谷浩、尾崎克己(1996). *Colletotrichum gloeosporioides* によるカンキツ品種「不知火」の幼果果頂腐敗症の発生. *九州病害虫研究会報* 42, 37-40.
3. Aiko Tanaka, Hiroshi Shiotani, Mikihiro Yamamoto and Takashi Tsuge (1999). Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 691-702.
4. Jinmei Zhou, Yutaka Hirata, Ill-Sup Nou, Hiroshi Shiotani and Tsutau Ito (2002). Interactions between different genotype tissues in citrus graft chimeras. *Euphytica* 126, 355-364.
5. Takao Ito, Tsutae Ito, Hiroshi Shiotani, Toru Iwanami, Katsumi Ozaki and Kazuyuki Muramoto (2007). Genetic diversity and a heterogeneous population of Citrus mosaic virus within a single citrus tree. *Journal of General Plant pathology* 73, 147-151.