

氏 名 (本 國 籍)	鈴 木 步 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 318 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 15 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	エンドウの細菌病に関する研究
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 助教授 瀧 川 雄 一 副査 静岡大学 教 授 露 無 慎 二 副査 岐阜大学 教 授 百 町 満 朗 副査 信州大学 教 授 大 政 正 武

論 文 の 内 容 の 要 旨

本学位論文は、近年静岡県伊豆地方において発生したエンドウの細菌性新病害について病原学的な研究を行い、その中で従来知られていなかった重要な新知見を多数得た成果をとりまとめたものである。

我が国有数のエンドウ産地である静岡県伊豆地方において、エンドウ茎葉の先端が黄白化する病害が発生し、細菌病と推測されたため病原細菌の調査を開始した。本菌はエンドウつる枯細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* と類似点が多く見られたが、同菌を含め既知のエンドウの細菌病では、決して黄白化症はみられない。細菌学的性状の調査より、従来のつる枯細菌病菌 *P. syringae* pv. *pisi* は A と B の 2 つの菌群に分けられたが、黄白化症分離株は A 菌群と細菌学的性状で一致した。黄白化症分離株は接種によりエンドウに水浸状斑を形成するとともに黄白化症状を再現したが、他の植物への寄生性は認められなかった。よって黄白化症分離株は、特異的な病徴を示す *P. syringae* pv. *pisi* の一系統と同定し、WT(White Top)菌群とした。さらに WT 菌群を含む *P. syringae* pv. *pisi* を遺伝子の面から比較した。Rep-PCR より、日本産の *P. syringae* pv. *pisi* には 2 つの系統 (WT+A 菌群と B 菌群) が存在していることを明らかとした。

罹病植物組織の顕微鏡観察を行い、罹病組織の細胞の葉緑体では、デンプン粒の蓄積や正常なグラナはごくわずかで、小胞が多く存在していた。よって WT 菌群により、葉緑体の分化が影響を受けているものと推測された。

日本産の菌株のレースについて調査した。B 菌群はレース 2 と判定された。A 菌群の中で、1 菌株のみレース 1 であり、これを A2 菌群とした。残りの A 菌群と WT 菌群はレース 7 であった。avr 遺伝子の分布を調査したところ B 菌群と A2 菌群は、それぞれレ

ース 2, レース 1 が所有するとされる *avr* 遺伝子のパターンと一致した。A 群菌では, *avrPpiA*, *avrPpiB* が検出されたが, 従来未報告の *avrPpiC* と ORF3 が検出されない菌株(A3 群菌)を発見した。残りの A 群菌(A1)は, 既報のレース 7 と一致した。WT 群菌は, A3 群菌と全く同一であった。さらに, 本調査の過程で *P. syringae* pv. *pisi* の全ての菌株に存在する新たな Hrp エフェクター候補の遺伝子を世界で初めて発見し *holPpiX* と命名した。

黄白化という特徴的な病徴を呈することから本菌の毒素生産の可能性が示唆された。いくつかの毒素遺伝子の存在調査を行ったが既知毒素遺伝子の存在は認められなかった。しかし, WT 系統は既知毒素生産菌と同様に抗菌活性を有しており, 23℃での培養と指示菌を *Erwinia ananas* とした際に明瞭に観察されることを明らかにした。

黄白化症発現に関与する遺伝子探索の過程で, 偶然にクローニングされてきた DNA 断片が, WT 群菌に特異的であった。そこでシークエンスより, 特異的検出を可能にする PCR プライマーを設計した。罹病植物体からの検出にも成功し, 病原細菌の検出に応用可能な PCR 法を確立した。

特異的遺伝子領域の全体像を解析するため, 特異的遺伝子領域約 40kb を含む 3 つのコスミドクローンを得た。様々な部位をサブクローンし, シークエンス解析を行った結果, およそ 20kb にわたり nonribosomal peptide synthetase (NRPS) 遺伝子や polyketide synthetase (PKS) と 60%程の相同性が認められ, そのコンセンサス配列も存在した。この特異的遺伝子領域は, NRPS と PKS が複合した構造をとっていた。*P. syringae* pv. *pisi* において NRPS や PKS 遺伝子を見い出したのはこれが世界初である。遺伝子や推定アミノ酸配列において相同性が見られる遺伝子はなく, 新規遺伝子であると推定された。

本遺伝子領域の機能を明らかとするために, pK18mobsac ベクターを用いて特異的遺伝子領域の一部約 4.0kb の欠失を試み, 遺伝子欠失株を選択することに成功した。変異株は水浸状斑を形成したが, 黄白化症状は見られなかった。特異的遺伝子領域が病徴発現に関与していることが強く示唆された。

本研究で得られた結果をもとに, 日本産の *P. syringae* pv. *pisi* の分類学的構造を考察したところ, WT, A, B の 3 つの菌群に類別された。さらに, A 群菌は, A1, A2, A3 のサブグループに分けられ, pv. *pisi* の多様性が示され, 進化の様相を推定できた。

以上を要するに, 本研究では, 新規病害の病原細菌を *P. syringae* pv. *pisi* の新たな一系統 (WT) と同定した。黄白化症状は, エンドウの葉緑体の異常により引き起こされることを明らかとした。日本産の *P. syringae* pv. *pisi* には 3 つのレースが存在していただけでなく, *avr* 遺伝子の分布で差違が見られた。また, 新たなエフェクター候補を見いだした。WT 群菌に特異的な遺伝子領域を発見し, WT 群菌の検出に有効な PCR プライマーの設計に成功した。WT 群菌特異的遺伝子領域は新規遺伝子であり, 変異株の解析により, この遺伝子領域が黄白化症発現に関与していることが強く示唆された。本研究で得られた遺伝子指標より, *P. syringae* pv. *pisi* の多様性を明らかとした。

本学位論文は、近年静岡県伊豆地方において発生したエンドウの細菌性新病害について病原学的な研究を行い、その中で従来知られていなかった重要な新知見を多数得た成果をとりまとめたものである。

我が国有数のエンドウ産地である静岡県伊豆地方において、エンドウ茎葉の先端が黄白化する病害が発生し、細菌病と推測されたため病原細菌の調査を開始した。本菌はエンドウつる枯細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* と類似点が多く見られたが、同菌を含め既知のエンドウの細菌病では、決して黄白化症はみられない。細菌学的性状の調査より、従来のつる枯細菌病菌 *P. syringae* pv. *lisi* は A と B の 2 つの菌群に分けられたが、黄白化症分離株は A 菌群と細菌学的性状で一致した。黄白化症分離株は接種によりエンドウに水浸状斑を形成するとともに黄白化症状を再現したが、他の植物への寄生性は認められなかった。よって黄白化症分離株は、特異的な病徴を示す *P. syringae* pv. *lisi* の一系統と同定し、WT(White Top)菌群とした。さらに WT 菌群を含む *P. syringae* pv. *lisi* を遺伝子の面から比較した。Rep-PCR より、日本産の *P. syringae* pv. *lisi* には 2 つの系統 (WT+A 菌群と B 菌群) が存在していることを明らかとした。

罹病植物組織の電顕観察を行い、罹病組織の細胞の葉緑体では、デンプン粒の蓄積や正常なグラナはごくわずかで、小胞が多く存在していた。よって WT 菌群により、葉緑体の分化が影響を受けているものと推測された。

日本産の菌株のレースについて調査した。B 菌群はレース 2 と判定された。A 菌群の中で、1 菌株のみレース 1 であり、これを A2 菌群とした。残りの A 菌群と WT 菌群はレース 7 であった。avr 遺伝子の分布を調査したところ B 菌群と A2 菌群は、それぞれレース 2、レース 1 が所有するとされる avr 遺伝子のパターンと一致した。A 菌群では、avrPpiA、avrPpiB が検出されたが、従来未報告の avrPpiC と ORF3 が検出されない菌株(A3 菌群)を発見した。残りの A 菌群(A1)は、既報のレース 7 と一致した。WT 菌群は、A3 菌群と全く同一であった。さらに、本調査の過程で *P. syringae* pv. *lisi* の全ての菌株に存在する新たな Hrp エフェクター候補の遺伝子を世界で初めて発見し holPpiX と命名した。

黄白化症発現に関与する遺伝子探索の過程で、偶然にクローニングされてきた DNA 断片が、WT 菌群に特異的であった。そこでシークエンスより、特異的検出を可能にする PCR プライマーを設計した。罹病植物体からの検出にも成功し、病原細菌の検出に応用可能な PCR 法を確立した。

特異的遺伝子領域の全体像を解析するため、特異的遺伝子領域約 40kb を含む 3 つのコスミドクローンを得た。様々な部位をサブクローンし、シークエンス解析を行った結果、およそ 20kb にわたり nonribosomal peptide synthetase (NRPS) 遺伝子や polyketide synthetase (PKS) と 60% 程の相同性が認められ、そのコンセンサス配列も存在した。この特異的遺伝子領域は、NRPS と PKS が複合した構造をとっていた。*P. syringae* pv. *lisi* において NRPS や PKS 遺伝子を見い出したのはこれが世界初である。遺伝子や推定アミノ酸配列において相同性が見られる遺伝子はなく、新規遺伝子であると推定された。

本遺伝子領域の機能を明らかにするために、pK18mobsac ベクターを用いて特異的遺伝子領域の一部約 4.0kb の欠失を試み、遺伝子欠失株を選択することに成功した。変異株は水浸状斑を形成したが、黄白化症状は見られなかった。特異的遺伝子領域が病徴発現に関与していることが強く示唆された。

以上の内容について審査した結果、学術上も応用上も極めて有意義な成果が得られていると判断され、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

Suzuki, A., Togawa, M., Ohta, K., and Takikawa, Y. (2003). Occurrence of white top of pea caused by a new strain of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Plant Disease 87: 1404-1410.

Suzuki, A. and Takikawa, Y. (2004). Cloning of specific DNA region of white top pathogen of pea and its detection by PCR. J. Gen. Plant Pathol. 70 (3): (in press).