

シリノマイシン類の毒性と病理学的意義

理化学研究所微生物制御研究室 ^{たむら}田村 ^{かつのり}勝徳・^{やまぐち}山口 ^{いさむ}勇
 東京農工大学農学部植物病理学研究室 ^{てら}寺 ^{おか}岡 ^{とおる}徹

はじめに

核果類かいよう病やマメ類褐斑細菌病などを引き起こす植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* は、自然界にもっとも幅広く存在すると考えられる細菌の一つで、単子葉及び双子葉植物を含む広範な宿主の葉や茎に壊死症状を引き起こす (BRADBURY, 1986)。本細菌は多犯性で非常に広い宿主範囲をもつことから、古くから重要な研究対象とされてきた。また、本細菌の病原性株の多くが *in vitro* で広範囲の原核・真核微生物に抗菌作用を示すとともに、種々の植物に対して毒性を示すシリノマイシンと呼ばれる毒素を産生する。本毒素によって生じる植物組織の症状は本細菌の感染によって生じる病徴と酷似していること、本毒素を産生しなくなった突然変異株の病徴発現能は著しく低下することなどから、本毒素は本細菌の病原性にとって非常に大きな役割を果たしているものと考えられている。それに加えて、本細菌のカンキツ類分離株及びライラック分離株はシリノマイシンと化学構造的に類似した毒素を産生すること、さらには本菌以外の数種 *P. syringae* 菌の病原型菌株も類似の毒素を産生することが最近明らかにされ、本毒素に対する関心が一段と高まってきている。こうした背景から、本稿ではシリノマイシン類に関するこれまでの研究成果を整理し、本毒素及びその産生細菌の種類、本毒素の毒理様式、本毒素産生の遺伝的背景ならびに病原性発現における役割について概観してみたい。

I シリノマイシン類と植物病原細菌

シリノマイシンは酵母やある種の糸状菌に対して抗菌活性を有する抗生物質として発見された (DeVAY and STROBEL, 1962)。しかし、まもなくシリノマイシンは本細菌の宿主植物以外の多くの植物種の葉や茎にも壊死症状を引き起こす、いわゆる宿主非特異的毒素であることが明らかにされ (BACKMAN and DeVAY, 1971; DeVAY et al., 1968; SINDEN et al., 1971)、それ以後は主に植物毒素として扱われるようになった。また、カンキツ類及びラ

イラックから分離される菌株はシリノマイシンと化学構造が類似しているだけでなく、同様の植物毒性及び抗糸状菌活性を示すシリノトキシシン (GROSS et al., 1977; GONZALEZ et al., 1981)、シリノスタチン (ISOGAI et al., 1989) をそれぞれ産生する (表-1)。

シリノマイシンは1962年にその存在が明らかにされていたものの、全化学構造が完全に決定されたのは80年代の後半になってからであった。本毒素は環状リポペプチド (図-1) で、*Bacillus circulans* 菌や *Erwinia herbicola* 菌の数種菌株が産生する抗生物質ポリペプチンに分類される。分子量は1226で (SEGRE et al., 1989)、ノナペプチド部分はセリン及び2,4-ジアミノブチリン酸がそれぞれ2分子、アルギニン、フェニルアラニン、ジハイドロアミノブチリン酸、 β -ヒドロキシアスパラギン酸及び4-クロロスレオニンがそれぞれ1分子からなる。N末端のセリン残基は4-クロロスレオニンのC末端と環状ラクトンによって連結され、またセリンは炭素数10ないしは16個の3-ヒドロキシ脂肪酸でアシル化されている。この脂肪酸側鎖の長短は本毒素の生物活性には影響ないといわれている (VATER, 1989)。一方、シリノスタチン及びシリノトキシシンは

表-1 シリノマイシン類を産生する細菌の種類

病原菌	宿主植物	毒素
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	インゲン	シリノマイシン
	トマト	〃
	トウモロコシ	〃
	ササゲ	〃
	サトウダイコン	〃
	梨果類 (ナシ, リンゴなど)	〃
	核果類 (ウメ, モモなど)	〃
	牧草類	〃
	クリ	〃
	バラ	〃
<i>P. syringae</i> pv. <i>aceris</i> pv. <i>aptata</i> pv. <i>japonica</i> pv. <i>pisi</i> sp.	ライラック	シリノスタチン
	カンキツ類	シリノトキシシン
	トウカエデ	シリノマイシン様
	サトウダイコン	〃
	オオムギ	〃
	エンドウ	〃
	キウイフルーツ, ネギ	〃

Toxicity of Syringomycins and its Pathological Significance. By Katsunori TAMURA, Isamu YAMAGUCHI and Tohru TERAOKA

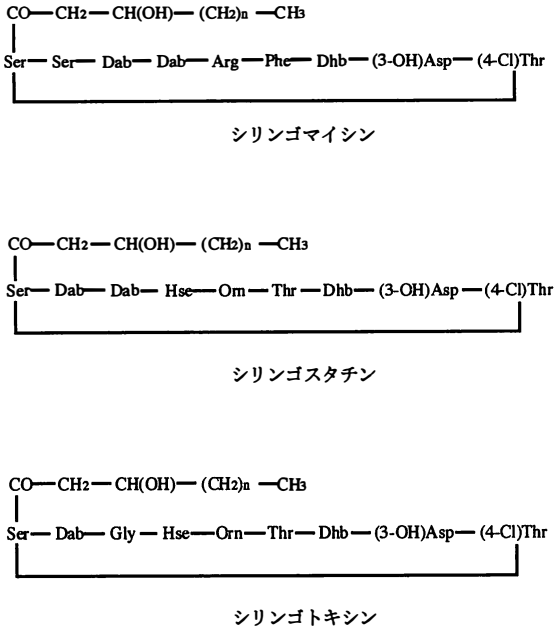


図-1 シリンゴマイシン類の化学構造 (SEGRE et al., 1989; ISOGAI et al., 1989., FUKUCHI et al., 1990 より)
 略号: Arg, アルギニン; (3-OH) Asp, 3-ハイドロキシアスパラギン酸; (4-Cl) Thr, 4-クロロスレオニン; Dab, 2,4-ジアミノプチリン酸; Dhb, 2,3-ジヒドロ-2-アミノプチリン酸; Gly, グリシン; Hse, ホモセリン; Orn, オルニチン; Phe, フェニルアラニン; Ser, セリン; Thr, スレオニン n=10~16.

シリンゴマイシンのアミノ酸が一部置換された類縁体で、シリンゴスタチンはアルギニン、フェニルアラニン及びセリン1分子がホモセリン、オルニチン及びスレオニンに置換され、シリンゴトキシシンはそれに加えて2,4-ジアミノプチリン酸がグリシンに置換されている。これら3種に共通して存在する2,4-ジアミノプチリン酸やホモセリンといったD-アミノ酸は毒素の活性及び安定性に関わっていると考えられている (KLEINKAUF and VON DOHREN, 1987)。また、これら毒素の化学構造の類似性から同一ないしは類似した生合成機構が関わっていることが示唆され、これらはシリンゴマイシン類 (syringomycins) と定義された (GROSS, 1991)。

本毒素は特に糸状菌 *Geotrichum candidum* 菌に対して顕著な抗菌活性を示すことから、これを利用して本毒素の簡便な産生検定を行うことができる (GROSS and DeVAY, 1976)。最近、この方法を利用して5属19種70菌株の植物病原細菌におけるシリンゴマイシン産生性が検討された。その結果、トウカエデ斑点細菌病菌 (*P.*

syringae pv. *aceris*)、テンサイ斑点細菌病菌 (*P. syringae* pv. *aptata*)、ムギ類黒節病菌 (*P. syringae* pv. *japonica*)、エンドウつる枯細菌病菌 (*P. syringae* pv. *psisi*)、キウイフルーツ花腐細菌病菌及びネギ類斑点細菌病菌 (いずれも *P. syringae* 菌に属し、病原型は未定) が、物理学的特性、植物毒性及び抗糸状菌活性においてシリンゴマイシンによく類似した毒素を産生することが明らかになった (表-1, TAMURA et al., 1994)。これらの細菌が産生する毒素の詳細な化学構造は未定であるが、*P. syringae* pv. *syringae* 菌以外の数種病原型細菌によっても類似の毒素が産生されるということは、*P. syringae* 群菌の分類、進化を考える上で重要であるとともに、これら病原型細菌の病原性機構を解明していく糸口にもなると考えられる。

II シリンゴマイシン類の毒素活性とその毒理機構

シリンゴマイシンはモモ新梢に壊死症状 (SINDEN et al., 1971) を、トウモロコシ、インゲンマメなど多くの植物種の葉に水浸、黄化、壊死等の症状を引き起こす (GROSS and DeVAY, 1976 b)。また、本毒素は低濃度で種々の糸状菌に対しても顕著な抗菌活性を示す。植物、糸状菌の両者に及ぼす毒素活性はほぼ同一の機構によるものと考えられる (REIDL and TAKEMOTO, 1987)。すなわち、植物や糸状菌細胞膜の過分極、 K^+ の急速な流出、 Ca^{2+} の流入、 H^+ -ATPアーゼの賦活など膜のイオン透過に様々な影響を与えることが観察されている (BIDWAI and TAKEMOTO, 1987; BIDWAI et al., 1987; MOTT and TAKEMOTO, 1989; ZHANG and TAKEMOTO, 1987; TAKEMOTO et al., 1991)。これらの一連の現象は Ca^{2+} チャンネルの解放が引金となって開始されると考えられ、引き続いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素の活性化が起こり、 H^+ ポンプや K^+ チャンネルを含む種々のタンパク質がリン酸化による活性化を受けるためと考えられている (TAKEMOTO, 1992)。また、微量のシリンゴマイシンは同様に K^+ の流出機構を活性化させることにより、葉の気孔を閉鎖するともいわれている (MOTT and TAKEMOTO, 1989)。このようにシリンゴマイシンは細胞膜の全体的な崩壊 (BACKMAN and DeVAY, 1971) を引き起こすのではなく、そのイオン透過機能に対する急速かつ継続的な影響により細胞致死をもたらすと考えられる。

一方、感染植物組織や精製シリンゴマイシンを処理した組織からは本毒素は検出できない。おそらく、本毒素が植物細胞膜に非可逆的に結合したためか、あるいは植物による酵素的分解あるいは代謝を受けたためと考えら

れている (GROSS and DeVAY, 1977c; SINDEN, et al., 1971)。したがって、本毒素が感染過程のどの時期に産生されているかは明らかではないが、本毒素産生細菌を液体培養すると、対数増殖期後期から定常期にかけて毒素活性が検出できることから (GROSS, 1985; GROSS and DeVAY, 1977b), 感染組織中での毒素産生も感染初期ではなく、ある程度感染が進行した頃と推測されている (Mo and GROSS, 1991)。

近年の分子生物学的手法の目覚ましい進歩から、植物病原細菌の病原性あるいは毒素産生性を物質レベルに加えて分子レベルでとらえることが可能となってきた。シリノマイシン及びシリノトキシン生合成についても、関連する遺伝子が細菌染色体上にクラスター構造をとっており (Mo and GROSS, 1991; MORGAN and CHATTERJEE, 1988), シリノマイシンでは SR 1 から SR 5 の 5 種のタンパク質 (分子量約 130 kD から約 470 kD) が、シリノトキシンでは ST 1 及び ST 2 という 2 種の大きなタンパク質 (分子量約 470 kD 及び約 435 kD) がそれぞれの生合成に関与していることが明らかにされている (MORGAN and CHATTERJEE, 1988; XU and GROSS, 1988b)。さらに、クローニングされたシリノマイシン産生遺伝子 (*syrB*) の発現を宿主植物由来の抽出成分存在下で検討したところ、興味深い結果が得られてきている。すなわち、宿主植物が共通してもつある種の芳香性 β -グリコシド類 (アルブチン, エスクリン, サリシン) が本遺伝子の発現を誘導する第 1 のシグナル分子として、さらに数種の糖類 (D-フルクトースやサッカロース) がその活性を増高する第 2 のシグナル分子として機能することが明らかにされている (Mo and GROSS, 1991a; Mo and GROSS, 1991b)。

III シリノマイシン類の病理学的存在意義

P. syringae pv. *syringae* 菌の病原性におけるシリノマイシン産生の役割は本細菌の毒素非産生変異株を作出し、その病原性を検定することで調べられている。すなわち、毒素産生能のみを失活した突然変異株をトランスポゾンの挿入失活法により作出し、その病原性を親株と比較して、毒素産生の本質的役割を明らかにしようとするものである。この手法により作出された毒素非産生変異株は親株と比べて、顕著に軽減された病斑しか形成しなかった。しかし、同変異株は宿主植物内で親株と有意差なく増殖した。このことからシリノマイシンは産生細菌の植物組織内における増殖を促進する働きはないと考えられた (XU and GROSS, 1988a)。これとほぼ同様の実験結果が、Tn 5 を挿入した *P. syringae* pv. *aptata* 菌

の毒素非産生変異株の病原性検定からも得られている (TAMURA et al., 1992)。これらの結果を総合すると、シリノマイシンは明らかに多くの宿主細胞を殺傷することにより、病斑拡大をもたらす働きがあるが、細菌の増殖促進や壊死斑自体の形成には本毒素以外の産物が関与していると考えられる。

ま と め

植物病原細菌がいかにして宿主範囲を決めているかは、多くの場合、依然として謎に包まれている。本毒素を含めて、現在までに発見されている植物病原細菌の毒素はその宿主特異性には関与していないとされている。ところが、最近のシリノマイシン生合成の遺伝的制御に関する研究から、宿主植物の特定の代謝産物によって本毒素の生合成が特異的に促進されることが観察され、本毒素がいわゆる宿主非特異的毒素であるにもかかわらず、遺伝子発現の制御レベルでは宿主植物を認識しうることが示されてきている。これは非常に興味深いことで、さらに今後の研究に詳細な解明が期待される。

前述したように、本毒素の植物毒性が病原性発現において重要な因子となっていることは確実であるが、広範な糸状菌や細菌に対して抗菌活性を有することの本質的な意義については想像の域を脱していない。考えられる可能性の一つは、無数の腐生菌が息息する植物体表面などの自然環境中で、生産菌が競争的に生存するために拮抗的役割を果たしていることである。

一方、本毒素の分子遺伝学的研究の成果から、植物の病害診断や防除の方法論に、新たな展開が期待できる。すなわち、シリノマイシン産生に関連する遺伝子 (*syrB* 及び *syrD*) が *P. syringae* pv. *syringae* 菌の各種分離株に高度に保存されていることから (QUIGLEY and GROSS, 1994), 他の植物病原細菌毒素コロナチンやファゼオロトキシンにおいて可能であったように (CUPPELS et al., 1990; SCHAAD et al., 1989), この生合成遺伝子をプローブにした迅速・簡便かつ高精度な病害診断や *P. syringae* 群菌の分類・識別が可能になるかもしれない。さらに、タバコ野火病菌のタブトキシン耐性遺伝子をタバコに導入して野火病抵抗性植物を作出した例 (ANZAI et al., 1989) のように、毒素の作用機作や病理学的な意義に関する知見の蓄積は病原性因子を標的とした病害防除あるいは病害抵抗性品種の育成など、病害制御の新たな戦略を導き出す大きな可能性を含んでいる。

本稿を終えるに当たり、日頃から何かとご指導を賜っている東京農工大学名誉教授渡辺実博士ならびに静岡农业大学農学部助教授瀧川雄一博士に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) ANZAI, H. et al. (1989) : Mol. Gen. Genet. 219: 492~494.
- 2) BACKMAN, P. A. and J. E. DeVAY (1971) : Physiol. Plant Pathol. 1: 215~234.
- 3) BIDWAI, A. P. and J. Y. TAKEMOTO (1987) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6755~6759.
- 4) ——— et al. (1987) : Plant Physiol. 83: 39~43.
- 5) BRADBURY, J. F. (1986) : Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB Intl. Mycol. Inst., Farnham Royal, England, pp. 175~177.
- 6) CUPPELS, D. A. et al. (1990) : Appl. Environ. Microbiol. 56: 1743~1749.
- 7) DeVAY, J. E. and G. A. Strobel (1962) : Phytopathology 52: 306.
- 8) ——— et al. (1968) : ibid. 58: 95~101.
- 9) FUKUCHI, N. et al. (1990) : Agric. Biol. Chem. 54: 3377~3379.
- 10) GONZALEZ, C. F. et al. (1981) : Physiol. Plant Pathol. 18: 41~50.
- 11) GROSS, D. C. (1985) : J. Appl. Bacteriol. 58: 167~174.
- 12) ——— (1991) : Ann. Rev. Phytopathol. 29: 247~278.
- 13) ——— and J. E. DeVAY (1977 a) : Physiol. Plant Pathol. 11: 1~11.
- 14) ——— (1977 b) : ibid. 11: 13~28.
- 15) ——— (1977 c) : Phytopathology 67: 475~483.
- 16) ——— et al. (1977) : J. Appl. Bacteriol. 43: 453~463.
- 17) ISOGAI, A. et al. (1989) : Agric. Biol. Chem. 53: 3117~3119.
- 18) KLEINKAUF, H. and H. von DOHREN (1987) : Ann. Rev. Microbiol. 41: 259~289.
- 19) MO, Y. -Y. and D. C. GROSS (1991 a) : Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 28~36.
- 20) ——— and ——— (1991 b) : J. Bacteriol. 173: 5784~5792.
- 21) MOTT, K. A. and J. Y. TAKEMOTO (1989) : Plant Physiol. 90: 1435~1439.
- 22) MORGAN, M. K. and A. K. CHATTERJEE (1985) : J. Bacteriol. 164: 14~18.
- 23) QUIGLEY, N. B. and D. C. GROSS (1994) : Mol. Plant-Microbe Interact. 7: 78~90.
- 24) REIDL, H. H. and J. Y. TAKEMOTO (1987) : Biochim. Biophys. Acta 898: 59~69.
- 25) SCHAAD, N. W. et al. (1989) : Phytopathology 79: 903~907.
- 26) SEGRE, A. et al. (1989) : FEBS Lett. 255: 27~31.
- 27) SINDEN, S. L. et al. (1971) : Physiol. Plant Pathol. 1: 199~213.
- 28) TAKEMOTO, J. Y. (1992) : Molecular Signals in Plant-Microbe Communications. CRC Press, Inc., Florida, pp. 247~260.
- 29) TAKEMOTO, J. Y. et al. (1991) : J. Gen. Microbiol. 137: 653~659.
- 30) TAMURA, K. et al. (1992) : Ann. Phytopathol. Soc. Japan 58: 599~600.
- 31) ——— et al. (1994) : ibid. 60: 483~486.
- 32) VATER, J. (1989) : Biologically Active Molecules, Springer-Verlag, Berlin, pp. 27~38.
- 33) XU, G. -W. and D. C. GROSS (1988 a) : Appl. Environ. Microbiol. 54: 1345~1353.
- 34) ——— and ——— (1988 b) : J. Bacteriol. 170: 5680~5688.
- 35) ZEANG, L. and J. Y. TAKEMOTO (1987) : Phytopathology 77: 297~303.

本会発行図書

『応用植物病理学用語集』

濱屋悦次 (前農林水産省農業環境技術研究所微生物管理科長) 編著 B6判 506ページ

定価 4,800円 (本体4,660円) 送料 380円

植物病理学研究に必要な用語について、植物病理学はもちろん、農薬、防除、生化学、分子生物学などについても取り上げ(約6,800語)、紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれぞれを英和、和英に分けてアルファベット順に掲載し、また、付録には植物のウイルス、細菌、線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学の専門家はもちろん広く植物防疫の関係者にとってご活用いただきたい用語集です。

お申し込みは前金(現金書留・郵便振替・小為替など)で直接本会までお申し込み下さい。