

トピックス

青枯病研究の最近の動向

—第3回国際青枯病シンポジウムから—

つち や けん いち
 土 屋 健 一

独立行政法人農業環境技術研究所

はじめに

2002年2月4日～8日、第3回国際青枯病シンポジウム(3rd IBWS)が南アフリカ共和国・ホワイトリバーで開催された。本会議は、5年ごとに世界中から各種植物青枯病(bacterial wilt)および病原細菌(*Ralstonia solanacearum*)の研究関係者が集まる。今回筆者は、実行委員の務めを兼ねて、第2回大会(1997年、Guadelupe島(仏))に続いて参加する機会を得た。

本稿では、同会議の概要と講演ならびにポスター発表の中からいくつかについて概説し、世界的な青枯病研究の現状と動向について紹介したい。

今回の会議では、米国、英国、フランス、オランダ、オーストラリア、ブラジルなどの常連国のほか、中国、フィリピン、タイ、インドネシアなど合計27か国から110余名が集まり、日本からは筆者一人が参加した。

開会挨拶の中で、SEQUEIRA博士(米/コスタリカ)が、*R. solanacearum*がバイオテロリズムの素材となりうるとの時宜を得た例えで、食料生産性に及ぼす本病の重要性を指摘した。基調講演では、実行委員長のHAYWARD博士(豪)が「青枯病研究における国際協調：進歩、展開そして課題」と題して、本シンポジウムの発端となった1976年の米国での国際ワークショップから今回に至る軌跡を紹介した。当時の参加者(数10名)の多くは今や斯界の大御所となり、改めてその歴史を感じさせられた。同氏は1986年～1999年の間、Bacterial Wilt Newsletterを編集し、世界中に情報を提供してきた。現在は、PRIOR(仏)およびFEGAN(豪)両氏に引き継がれ、Web of Bacterial Wilt (<http://ibws.nexenservices.com/>)としてアップデート情報が公開されている。ELPHINSTONE(英)は、前回会議以降に発表された論文ならびに各国研究者に対するアンケート調査に基づき、最近

の研究分野、新宿主を含む対象植物および診断・検出技術と防除法の展開等についての動向について話題提供した。

過去5年間の約450件の報告から研究分野の動向を見ると、抵抗性品種の育種・選抜、および病原細菌の多様性・分布ならびに宿主範囲に関する研究がほぼ同率で高く、次いで病害の防除・管理、病原性機構・宿主-細菌相互作用となっている。本病に対する生物防除法の開発研究も増加しており、病原細菌の診断・検出技術の開発や発生生態研究が続いている(図-1)。一方、対象作物については、ナス科作物が中心であり、トマト、ナス、トウガラシおよびタバコが米国およびアジアなど広範囲地域から報告されるのに対して、従来、南米を中心としたジャガイモ青枯病(race 3, biovar 2)が、最近、欧州各国に侵入、拡大していることから、同地域からの報告が増えているのが注目される(図-2)。中国ほかにおけるピーナッツや中南米、フィリピンおよびインドネシアでのバナナ(Moko病、BDB病)、およびハワイ、イ

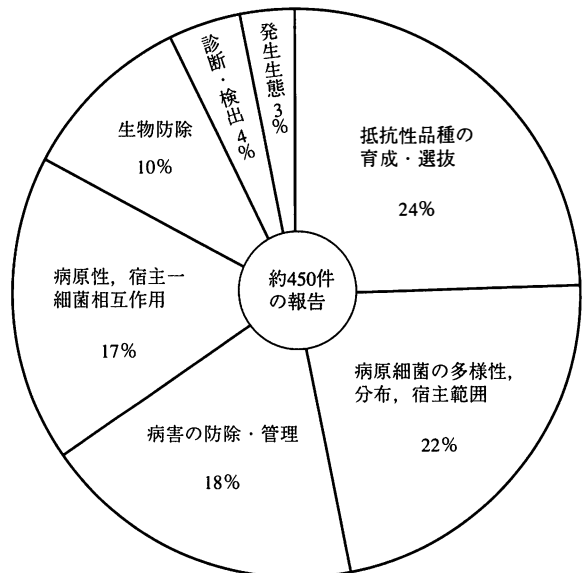


図-1 過去5年間(1997～2001)における青枯病菌に関する研究内容の世界的動向

The Current Bacterial Wilt Research: A Global Overview in the 3rd IBWS. By Ken-ichi TSUCHIYA

(キーワード：第3回国際青枯病シンポジウム、発生生態、遺伝的多様性、ゲノム全塩基配列、phenotypic conversion、抵抗性育種)

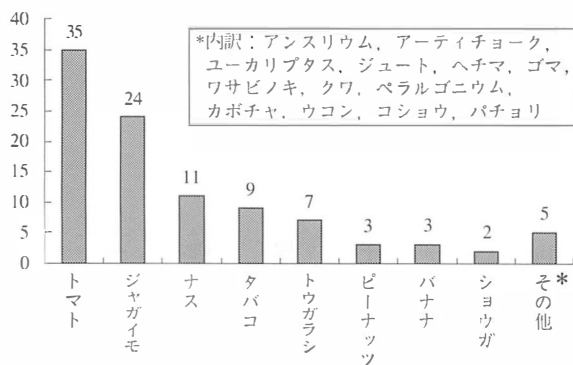


図-2 最近5年間の報告(約450件)における研究対象作物の割合(%)

ンド、タイそして日本におけるショウガなどは地域限定ながら、いずれも経済作物として重要度が高い。また、新規宿主の報告も相次いでおり、後述するように欧米におけるジャガイモ青枯病の侵入・拡大に関連する感染源としての役割が明らかになった花きや雑草類も報告されている。

I セッション1：発生生態

講演5題とポスター7題が発表された。VAN ELSASら(オランダ)は欧州におけるジャガイモ青枯病の拡大について、低温下での病原細菌の生理反応と適応性の重要性を指摘した。非病原性変異株(PC型)から病原型(WT)への復帰が感受性トマトの根渗出液によって誘導可能であり、4°Cに保った土壌および水系においては、WTの多くが viable but nonculturable (VBNC)化するが、トマト実験系で復帰細胞が得られたこと、低温反応性と炭素源欠乏との間に関連性があることを報告した。SMITHら(英)は、非病原性変異株を用いた生物防除ならびに DGGE 法による土着微生物相への影響評価について報告した。JANSEら(オランダ)は、ケニアから切り花材料として欧州市場に導入されたペラルゴニウム属(ゼラニウム)が、ジャガイモ系統に潜在感染しており、2000年9~12月にベルギー、オランダ等の圃場で発生した青枯病系統との同一性をDNA解析等によって明らかにした。また ALLENら(米)は、米国ウイスコンシン州および南ダコタ州の萎凋ゼラニウム(栄養体はグアテマラ起源)から、特異プライマーを用いたPCRにより同系統を確認し、両地域のジャガイモ青枯病への感染源となっている可能性を示唆したが、既存の間接ELISAキットによる診断は困難であったことを報告した。

II セッション2：病害の防除・管理

講演7題とポスター7題の発表があった。PRADHANANGら(米/ネパール)は、各種の植物性精油(チモール、パルマローザ、レモングラス等)について土壌混入処理によるトマト青枯病に対する防除効果を試験した結果、とくにチモールにおいて、biofumigant 素材としての有効性を示唆した。一方、SAR(全体的獲得抵抗性)を誘導する微生物農薬 Actigard と Messenger、および2種の PGPR について感受性および抵抗性トマト品種に対する効果を試験した結果、Actigard は抵抗性品種(Neptune, BHN 466)では有意な抑制効果が認められ、総合防除における抵抗性増強補足手段としての役割が示唆されたが、感受性品種(Equinox)では効果が低かった。ARTHYら(豪)は、土壌に添加された *Brassica* 属植物の分解により生じるイソチオシアネートによる biovar 3 系統の密度低減効果を見出し、biofumigant としての可能性を示した。KUMARら(インド)は、ショウガ青枯病(biovar 3)の一次伝染源を絶つ目的で、保菌根茎に対する太陽熱あるいはマイクロ波(高周波加熱)処理の効果を検討した。その結果、ポリエチレン袋に詰めた根茎(250g)を陽光下で2時間、あるいはマイクロ波(4~5c/s)で30秒間処理した場合、根茎の温度はそれぞれ50°Cおよび45°Cとなり、発芽力を減じることなく菌を減少させた。圃場でそれぞれ2時間、陽光処理した場合、移植後3か月間発病しなかったのに対し、無処理では33.6%が発病した。WOODら(英)は、スコットランドで新たに確認されたジャガイモ系統(biovar 2)について、感染源調査の結果、灌漑用の河川および支流の最上流域で高い感染、萎凋を示す野草 *Solanum dulcamara* (ヒヨドリジョウゴ類似種)が見出された。同雑草の撲滅を期して、2001年6月に、グリホサート除草剤の散布が行われた結果、多くは死滅し、病原菌による河川水の汚染も有意に低下し、さらに一部枯死植物の根系等で残存した低レベルの菌についても、9月の2回目の除草処理によりほぼ根絶に近い成功を収めた。

III セッション3：病害抵抗性育種

講演6題とポスター10題が発表された。BOSHIUら(中国)は、中国の年間全栽培面積の約10%(50万hr以上)を占めるピーナッツ生産において、青枯病感受性品種の10~30%以上が被害を受けている。過去10年間の抵抗性増強策から、これまでに126系統(28系統は海外導入)を抵抗性 germplasm として同定し、抵抗性

genotype も栽培 4 種全て、および野生 *Arachis* 種 24 系統からそれぞれ同定され、過去 10 年で 7 抵抗性品種が育成された。Fock ら (仏) は、交雑育種法による *Solanum* 属野生種からの抵抗性遺伝子導入における中度抵抗性、あるいは表現形質の野生型化等を改善するため、新たな抵抗性遺伝子資源である *S. phureja* および *S. stenotomum* について、プロトプラストの電気細胞融合による体細胞雑種を作成し、栽培種への抵抗性導入を図った。作出された雑種植物は、強勢であり葉形、花およびイモの形態的特性は中間的であり、DNA 解析から多くは 4 倍体であった。各種の isozyme 型、RAPD や SSR マーカーによる解析後、race 1 および race 3 に対する抵抗性の評価を行った。栽培ジャガイモは両系統に対して感受性であったが、*S. phureja* との雑種は 2 例を除き、race 1 に抵抗性、race 3 には感受性であった。複二倍体の 1 クローンは両方に抵抗性を示した。一方、*S. stenotomum* との雑種は、両系統に対してそれぞれ野生種と同程度の高度抵抗性または耐性を示した。Stoll ら (南ア共和国) は、土壌のミネラル欠乏による青枯病抵抗力の増強に関連して、亜鉛 (Zn) 施用の有効性を報告した。

IV セッション 4: 発病と宿主反応

講演 5 題とポスター 2 題が発表された。Denny と Liu (米) は、トマトに病原性を示す野生株 AW 1 から各種の GFP (GFP-UV, ECFP-S 72 A, GFP-mut 2, GFP-mut 3) 発現株を作出し、その 1 株 AW 1-gfp 38 を用い、トマト根 (無傷接種) における感染過程を観察した。その結果、(i) 側根の表皮細胞内へは 1 日以内に定着し、(ii) 感染根によっては、2 日以内に維管束部に侵入し、(iii) 初期病徴が現れる 4 日までに植物全体で一つ以上の木部導管に定着が進み、(iv) 4 日までに病原細菌は茎部の髄および皮層に移動し、その後すべての植物組織への侵入が観察された。また、AW 1 株の type II (out) または type III (*hrp*) 分泌系および EPS 産生性に関わる各変異株のゲノム中に *gfp* 38 プロモーターを挿入した場合の影響について検討した。Vesse ら (仏) は、抵抗性トマト品種 Hawaii 7996 に GMI 1485 株 (GMI 1000::Tn 5-*lacZ*) を接種した時の根部感染を感受性品種と比較した。10 日後には、後者の 50% が萎凋したのに対し、Hawaii 7996 では、4 週間後でも 10% 以下であり、側根の多くは外部皮層の細胞間隙のみ感染が認められた。維管束細胞に到達した細菌も導管定着はほとんど認められず、細菌の多くは宿主細胞壁に由来すると思われるポリフェノール物質に封入されて変性し、隣

接細胞も同物質の沈着や原形質分離が認められた。両植物の培養細胞への接種の結果、Hawaii 7996 区から低分子量芳香族物質が検出され、HR 様の防御機構が示唆された。また *hrpG* 変異株による同品種の反応は侵入型ではなく、hyperinfective であることから *hrp* オペロンへの依存性が検討された。Haute ら (フィリピン) は、トマト品種 Hawaii 7996 と感受性品種 WVa 700 との F₂ 組換え体自殖系統 (RILs)_n に関して 80 マーカー (72 AFLP, 7 RGA, 1 SSR) からなるリンケージマップを作成した。189 系統について 2 菌株 (Tm-22, Tm-151) に対する抵抗性の選抜を行った結果、少なくとも七つの AFLP と一つの RGA (resistance gene analog) マーカーが同定された。また、一つの相互優性 AFLP マーカー (af 02 b/af 02 c) と Hawaii 7996 における本病抵抗性 QTL (LOD>5.0) の一つが強くリンクしていることが示された。Marco (仏) らは、*Arabidopsis thaliana* と青枯病菌 GMI 1000 について *hrp* 依存型の感受性 ecotype Col-5 に対して、抵抗性の同 Nd-1 では第 5 染色体に座乗する 1 個の劣性遺伝子 (*RRS1*) が関係することを明らかにし、ポジショナルクローニングにより単離した。一方、最近フランスにおいて分離された 1 系統 14.25 は ecotype La-er に病原性、Col-0 に無病徴反応を示すが、後者の抵抗性が三つの遺伝子に支配されており、二つは第 2 染色体に、他一つは第 5 染色体にそれぞれ座乗していることが判明した。Laurena と Mendoza (フィリピン) は、抵抗性および感受性トマト品種における細胞壁の化学組成を比較し、前者の根および茎で、Extensin (ヒドロキシプロリンに富む糖蛋白) が 25~45%、リグニンが 14~24%、それぞれ高く、またプロアントシアニジンは根部で 4~5 倍、茎部で 6~7 倍それぞれ高かったことを報告した。

V セッション 5: 病原細菌の遺伝子

講演 6 題とポスター 7 題が発表された。Boucher ら (仏) は、GMI 1000 株のゲノムの全塩基配列の達成について報告した。トマト由来で race 1, biovar 3 に類別される同菌株のゲノムは、3,716,413 bp の染色体と、2,094,509 bp の巨大プラスミドの二つのレプリコンからなり、両方で 5,000 以上のタンパクをコードする。前者には、細菌の生存に必須な遺伝子が、また後者には、種々の環境適応性、すなわち EPS やべん毛産生、化合物分解および重金属耐性等に関わる遺伝子が存在する。毒素、酵素、植物ホルモン、シグナル分子等の産生、および各種 pilin や宿主細胞への付着に重要な役割を果たす物質生産等、病原性と関連する 200 以上の候補遺伝子

が二つのレプリコン上に同定された。また、*hrp* 遺伝子群により制御されるタイプIII分泌系を介して分泌される HrpY, PopF 1, PopF 2 などについても、50 以上の関連遺伝子が同定された。ゲノム配列のアノテーション(塩基配列から機能を推定する)の過程で、ゲノムの約 7% が、コドン使用頻度に関して本細菌のゲノム上の遺伝子一般の傾向とは異なっていた。ACUR (abnormal codon usage regions) と称するこれらの領域では、ゲノム全体で見出される平均 67% の GC 含量とは異なる塩基組成を示し、また種々の可動性因子 (IS, プロファージ等) と関連していることから、それらが遺伝子の水平移動によって獲得された可能性を示唆した。病原性に関わる遺伝子候補の多くが ACUR に存在することから、青枯病菌の宿主特異性に関連する遺伝的多様性や機能解析に向けて新たな展開が期待されるところである。なお、GMI 1000 株のゲノムの全塩基配列は、<http://sequence.toulouse.inra.fr/R.solanacearum> で公開中であり、また論文も発表された (SALANOBAT et al., 2002)。ALLEN ら(米)は、青枯病菌の感染初期の侵入と定着に関連して、病原因子としての EPS, セルラーゼ, PG 等の発現および運動性について報告した。これら病原因子の発現は PhcA により制御され、また細菌密度に依存し、低密度では PG 群遺伝子発現および運動性はともに高まる。3 種類の PG 遺伝子に関する変異株を利用して、同酵素産生能の病原力への関与が確認されたが、ガラクトロン酸トランスポーター遺伝子 (*exuT*) 欠失変異株では病原力は低下しないことから PG は病原菌への栄養供給的関与はないと推察された。一方、3 種類の非運動性変異株 (FliC, FliM, FliHDC) は、土壌灌注ではいずれも病原力が低下したが、直接維管束に接種した場合には完全に病原性を示すことから、本細菌の運動性は感染初期に宿主植物への侵入と定着を容易にすることが主要な機能と推察された。VAN GUSEGEM ら(仏)は、Hrp 系を介して分泌されるタンパク質 PopA がペチュニアに誘導する二つの反応(反応型, 抵抗型)について報告し、PopA に対する反応が一つの優性遺伝子に制御され、またそれが第 4 染色体に座乗することを示した。同 PopA 反応遺伝子座を非反応型 Tr 66 系統に導入して作出された near-isogenic line では、PopA に対する反応は抵抗性との関連が示され、反応型ペチュニア葉に PopA を注入後、cDNA-AFLP を用いた転写プロファイル解析の結果、注入後 1 時間以内に多くの遺伝子に変化が認められ、複数のストレス関連遺伝子等が同定された。TRIGALET ら(仏)は、本細菌の phenotypic conversion (PC 化)に関連して、多くの PC 変異株で、プロモータ

一周辺領域に 2 個の遺伝子欠失と六つの IS (IS 3, IS 4 および IS 5 各ファミリー) を同定した。PC 株を接種したトマトでは、21 日後でも無病徴であるが、細菌は 12 日後でも約 10^5 cfu/g で茎の上胚軸で検出された。その後、約 10^3 cfu/g の低頻度で WT 様復帰変異株が分離され、無菌培養植物系でも追認された。復帰株は、トマトに病原性で、*phcA* の PCR と塩基配列から WT との同一性が確認された。培地上では、復帰は全く認められず、本細菌は WT⇄PC の二相は *in vitro* で可逆的であり、PC→WT には感受性トマトが影響すると推察した。ROBERTSON ら(米)は、HR 誘導に関連する *avrA* とハイブリダイズする約 6-kb の *EcoRI* 断片をともに有するが、タバコに対する反応性が異なる南北カロライナ州産株およびジョージア州産株について比較解析し、*avrA* の PCR の結果、804-bp または約 980-bp の増幅型に分かれ、前者は HR(+)、後者は HR(-)であった。各州からの HR(-)3 株について、*avrA* をクローニングし野生株 AW 1 の *avrA* allele と比較した結果、ジョージア株 (GA 102) では 155-bp の、また南北カロライナ株 (NC 116, SC 06) では 180-bp の挿入配列がそれぞれ *avrA* 内部に見出され、前者は新規配列であったが、後者は AW 1 株の *phcA* 上流の 722-bp の遺伝子間領域内の 171-bp 断片と 99% 以上の相同性を示し、他の選抜株でもゲノム内の複数個所で同 180-bp 挿入配列とハイブリダイズするものが認められた。

IV セッション 6: 多様性と診断

本セッションにおいては、講演 6 題、ポスター 9 題が発表された。筆者らは、「日本におけるショウガ科植物青枯病の発生と病原細菌の多様性」と題して講演した。ショウガおよびミョウガは、香辛料あるいは薬用作物として古くから栽培されており、高知県は我が国生産高の半分を占める主要産地である。1995 年夏、タイから導入され同県で栽培されている切花用 *Curcuma* 属植物に、国内未報告の青枯病が発生した。その後、1997 年にショウガ、1999 年にはミョウガと、3 種のショウガ科植物に青枯病の発生が確認され、現在も拡大が危惧されている。罹病植物からの分離菌について、細菌学的性質および各種植物に対する接種試験の結果、病原菌は一樣に *R. solanacearum* biovar 4 と同定され、またジャガイモなど供試植物の多くが萎凋したが、トマトでは品種間で反応が異なり、またタバコ葉には顕著な HR が誘起された。分離菌株の DNA について、BOX または ERIC プライマーを用いた rep-PCR 解析を行った結果、宿主および発生時期により、二つの DNA パターン (I

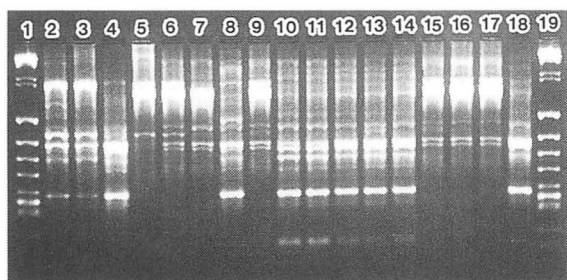


図-3 BOX-PCRによる各国産ショウガ青枯病菌のDNAパターン

レーン1, 19: λ /HindIII+ ϕ X 174/HincII, 2~4: インドネシア, 5~9: タイ, 10, 11: 中国, 12~17: 日本, 18: オーストラリア,

型, II型)に類別された。ショウガ分離株の一部, *Curcuma* 分離株およびミョウガ分離株すべてがI型であったのに対し, ほとんどのショウガ分離株はII型を示した。これら両DNAパターンは, 同県産の各種青枯病菌および日本産代表 race 1, 3株および biovar 2, 3, 4株のDNAパターンとはいずれも異なった。一方, 海外産株との比較から, I型はタイ産のショウガおよび *Curcuma* 分離株と, またII型はオーストラリアおよび中国産のショウガ分離株が示すDNAパターンとそれぞれ相同であった(図-3)。以上の結果から, 我が国で発生した同科植物青枯病は, 異なる時期に海外から侵入した二つの系統に起因しており, それぞれ別々の経路で伝染を拡大しているものと推察された。現在, 土壌および根茎の診断用に免疫抗血清およびPCR特異プライマーを作製中である。ALVAREZら(米)は, ハワイにおけるショウガ青枯病菌株の特性と検出について報告し, 血清学的および表現形質からトマト由来の race 1およびバナナ系統 race 2に類似するが, ジャガイモおよびゼラニウム由来の race 3とは顕著に異なること, またRFLPおよびAFLP解析からショウガ系統は互いに類似性が高いものの, 他系統とは低いことを示した。ショウガに対する強病原力株を免疫して作製した2種のモノクローナル抗体(MAB)はEPSに対して高い反応性を示し, EPS(-), 運動性(+)の変異株とは反応しなかった。また両MABは熱処理菌のEPSと反応することから根茎に高頻度に共存する *Enterobacter* 属等から容易に識別できた。POUSSIERら(仏)は, 生試料からのPCR反応に

おける阻害要因を軽減する方法として, magnetic beadsを用いたDNAカプチャー法と市販のQIAampキットがともに有効であり, 特に後者は土壌試料からの検出に優れることを示した。またPCR反応液への血清アルブミンやT4ファージのprotein 32の添加は本菌の検出感度を高めるのに有効であることを報告した。

また, バナナ青枯病についての特別セッションで, Nutterら(米)のチームは, global positioning satellite system (GPS)を利用した広大なアマゾン地域におけるMoko病の発生地図の作製について, Supriadi(インドネシア)は, 同国でのblood disease病(BDB)の発生拡大の状況について, それぞれ最新情報を話題提供した。

おわりに

青枯病菌GMI 1000株のゲノムの全塩基配列の決定は, 今後, 病原性関連遺伝子を始めとする種々の機能遺伝子の同定が起点となり, 遺伝的多様性, 分類体系, 宿主特異性と抵抗性, 遺伝子診断法の開発そして抵抗性品種の育成, それらを総合した有効な防除体系の確立等々, 基礎から応用まですべての分野へ波及し, 新知見の集積と飛躍的な技術進歩がもたらされることを期待させるのに十分な輝かしい成果である。

次回の本シンポジウム(4th IBWS)は2007年夏に英国内で開催される予定である。これからの5年間で研究分野の動向は, どのように変わるであろうか。世界が共有する問題に着実な達成を重ねつつ, 新たな軌跡が築かれることを祈りたい。

誌面の都合上, 多くの報告についての紹介ならびに文献を割愛したが, 関連情報の一部については, 堀田(2001)および土屋ら(2000)を参考にされたい。なお, 今回のシンポジウムでの講演内容については, "Bacterial Wilt: The disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex" (ALLEN, PRIOR and HAYWARD 共編)としてAPS Pressから出版予定である。

引用文献

- 1) 堀田光生(2001): 植物防疫 5: 499~502.
- 2) SALANOUBAT, M. et al. (2002): Nature 415: 497~502.
- 3) 土屋健一ら(2000): 植物防疫 54: 87~92.