

イネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) の 産生するポリガラクトツロナーゼについて

福谷 友美・飯山 和弘・古屋 成人・松山 宣明
(九州大学農学部)

Studies on polygalacturonase produced by *Burkholderia glumae*. Tomomi FUKUYA, Kazuhiro IYAMA, Naruto FURUYA and Nobuaki MATSUYAMA (Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581)

A high correlation was found between rotting ability of potato tuber and polygalacturonase (PG) production in *Burkholderia glumae*. PG was always detected in rotted potato tissues infected with virulent strains. For isozyme analysis of PG produced by *B. glumae*, proteins obtained from potato rotting tissues and culture filtrates were subjected to native-polyacrylamide gel electrophoresis and assayed with an ultrathin polygalacturonic acid-agarose overlay stained with ruthenium red. Two bands of hydrolytic activity were detected, indicating that *B. glumae* produces at least two isozymes of PG.

Key words: *Burkholderia glumae*, polygalacturonase, potato rot

イネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae* によって引き起こされるイネ幼苗腐敗症は、イネ幼苗に病原性を有する他種細菌、すなわちイネ褐条病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*、イネ苗立枯細菌病菌 *B. plantarii* による罹病幼苗には認められず、本細菌に特徴的な症状であるとされている^{4, 9, 10}。本細菌は各種野菜組織腐敗能を有し¹²、腐敗症状発現には細胞壁分解酵素ポリガラクトツロナーゼが関与することが示唆されている¹¹。一方、植物病原微生物の中には同一の働きを持つ複数のイソ酵素を産生するものがある。例えば、*Erwinia chrysanthemi* は少なくとも5種のペクチン酸リアーゼ(ペクチントランスエリミナーゼ)を産生し、それぞれのイソ酵素の植物体での発現量並びに腐敗症発現への関与の程度は異なっていることが知られている^{5, 10}。そこでイネもみ枯細菌病菌が複数のポリガラクトツロナーゼを産生しているか否かについて検討した。

材 料 と 方 法

1. ジャガイモ組織腐敗能の検討

供試菌株として Table 1 に示したイネもみ枯細菌病菌を計38菌株用いた。表面殺菌したジャガイモ塊茎を厚さ約1cmに切断し、これを濾紙を敷いた滅菌ペトリ皿に置き、滅菌水を5ml入れた。これに YPDA (ペプトン

0.6g, デキストロース3g, 酵母抽出物3g, 寒天15g, 蒸留水1,000ml, pH 7.2) 斜面培地で30℃, 48時間培養したイネもみ枯細菌病菌を切断面の中央部に1白金耳量接種した後、30℃に3日間保温し、腐敗能の有無を検討した。

2. 粗酵素液の調製

a. ジャガイモ腐敗組織汁からの調製

前述した方法で、イネもみ枯細菌病菌をジャガイモ切片に接種した。腐敗組織を、遠心分離(13,000×g, 4℃, 20分)し、細菌ならびに植物組織を除去した。得られた上清に90%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、攪拌しながら4℃で12時間放置した。これを遠心分離し、得られた沈澱を少量の蒸留水に懸濁し、充分量の蒸留水に対し透析した。透析膜内に残った試料をジャガイモ腐敗組織由来の粗酵素液とした。

b. 培養ろ液からの調製

0.1%ポリガラクトツロン酸を加えた YPD 液体培地にイネもみ枯細菌病菌を移植し、30℃で24時間振盪培養した後、13,000×g, 4℃で20分間遠心した。得られた上清を用いて、上記と同様の方法で硫酸沈澱ならびに透析を行った。透析膜内に残った試料を培養ろ液由来の粗酵素液とした。

Table 1. Relationship between potato rotting ability and activity of polygalacturonase (PG) produced by the strains of *Burkholderia glumae* in culture and in potato tuber slices

Strain	Origin ^{a)}	Potato rot ^{b)}	PG activity ^{c)}		Strain	Origin	Potato rot	PG activity	
			potato tuber	in culture				potato tuber	in culture
N7401	NIAS	+	+	+	Ku8114	KU	+	+	+
N7502	NIAS	+	+	+	Ku8115	KU	+	+	+
N7505	NIAS	+	+	+	Ku8116	KU	+	+	+
YN7805	NIAS	+	+	+	Ku8121	KU	+	+	+
806	NIAS	+	+	+	Ku8122	KU	+	+	+
So-1	FARC	+	+	+	Ku8112	KU	-	-	+
8001	KNAES	+	+	+	Ku8117	KU	-	-	+
8015	KNAES	+	+	+	Ku8119	KU	-	-	+
8028	KNAES	+	+	+	Ku8120	KU	-	-	+
I	KNAES	+	+	+	N7501	NIAS	-	-	+
III	KNAES	+	+	+	N7503	NIAS	-	-	+
2	KNAES	+	+	+	N7504	NIAS	-	-	+
Ku8101	KU	+	+	+	YN7825	NIAS	-	-	+
Ku8102	KU	+	+	+	742	NIAS	-	-	+
Ku8103	KU	+	+	+	752	NIAS	-	-	+
Ku8104	KU	+	+	+	805	NIAS	-	-	+
Ku8105	KU	+	+	+	P1-22-1	NIAS	-	-	+
Ku8111	KU	+	+	+	P1-22-3	NIAS	-	-	+
Ku8113	KU	+	+	+	P1-22-4	NIAS	-	-	+

a) NIAS, National Institute of Agricultural Sciences; FARC, Fukuoka Agricultural Experiment Station; KNAES, Kyushu National Agricultural Experiment Station; KU, Kyushu University.

b) Surface-sterilized potato tubers were sliced in ca. 1cm-thickness aseptically, and placed on filter paper impregnated with sterilized water in Petri dish. Bacteria grown on YPDA medium were smeared on the center of potato tuber slices. Two days after incubating tubers at 30 °C, the rotting ability of *B. glumae* was estimated.

c) Samples obtained from culture filtrates and potato tubers inoculated with *B. glumae* were used. Polygalacturonase activity was assayed with an ultrathin polygalacturonic acid-agarose overlay stained with ruthenium red.

3. ポリガラクトツロナーゼの産生性

アガロース—基質薄層⁶⁾ (0.1%ポリガラクトツロン酸, 1%アガロース, 50 mM 酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0, 5 mM EDTA) 用ゲル 5 ml を予め 50°C で保温しておいた直径 9 cm のガラス製ペトリ皿に流し込み固化させた後, その上に 5 μ l の粗酵素液を滴下し, 30°C で 30~60 分保温した。その後, 0.05% ルテニウムレッドで 20 分間染色し, 過剰の染色液を洗い流した。本試薬により赤く染まらない場合を陽性とした。

4. イソ酵素分析

イソ酵素の分析には, 強病原性菌株 2 を用い, ジャガイモ腐敗組織および培養液由来の粗酵素液を供試した。酵素の失活を防ぐために未変性ポリアクリルアミドゲル (pH 4.3) によりタンパクを分離した (100V, 6時間)。通電中はジュール熱による酵素の失活を防ぐために泳動槽を冷却しながら泳動を行った。泳動後ガラス板よりゲルを取り出し, 活性染色に用いた。すなわちゲルを 100 mM 酢酸ナトリウム—酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中に 10 分間

浸漬した後, 厚さ 1 mm のアガロース—ポリガラクトツロン酸薄層に気泡が入らぬように重ねた。乾燥防止のため周囲をプラスチックフィルムで覆い, 30°C で 20 分間保温した。その後, 0.05% ルテニウムレッドで染色した。また総タンパクを染色するために, 銀染色した。

結 果

Table 1 に示したように, ジャガイモ腐敗能とポリガラクトツロナーゼ活性との間に高い相関が認められた。すなわち, 腐敗組織には必ずポリガラクトツロナーゼが存在しており, 腐敗を誘導しない菌株を接種したジャガイモ塊茎からは同酵素は検出されなかった。しかしながら, 培地中では全ての菌株がポリガラクトツロナーゼを産生することが明らかとなった。

ジャガイモ腐敗組織ならびに培養液由来の粗酵素液の未変性ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動後の銀染色および活性染色を Fig. 1 に示した。ルテニウムレッドにより染まらない部分すなわち酵素活性バンドが

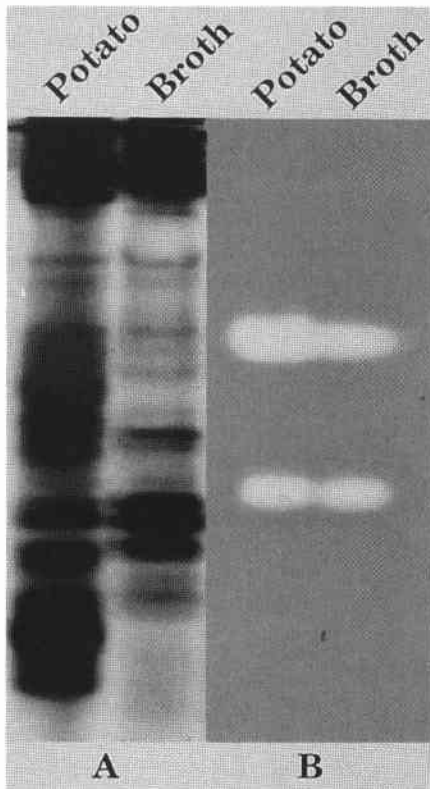


Fig. 1. Detection of polygalacturonase produced by *Burkholderia glumae* strain 2.

A: Silver stained proteins B: Activity-stained overlay.

Potato: Proteins extracted from inoculated potato-tuber

Broth: Proteins extracted from polygalacturonic acid-grown culture.

Proteins were separated by native-polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.3. Polygalacturonase was detected 20 min after incubating with polygalacturonic acid-agarose overlay containing 100 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 5.0) and 10 mM EDTA.

二本検出され、ジャガイモ腐敗組織には少なくとも二種類のポリガラクトナーゼが存在することが明らかとなった。未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、荷電および分子量の二つの性質の違いが泳動に表れるものであり、これら両酵素の性質においてどの点が異なっているのか、現段階では不明である。また、ジャガイモ腐敗組織および培地中より調製したタンパク中のポリガラクトナーゼの酵素パターンは同一であった。

考 察

植物病原細菌の産生する病原因子として、植物毒素、

各種酵素、植物ホルモン、菌体多糖等が知られており、病原性あるいは病徴発現との関与が証明、あるいは論じられている。イネもみ枯細菌病は宿主非特異的毒素トキソフラビンを生じ^{1, 7)}、病徴発現機構において重要な役割を担っていることが明らかとなっている^{3, 8, 13)}。しかしながら本菌によって引き起こされるイネ苗腐敗症および各種野菜組織腐敗能に関する研究は少なく、その発病機構には不明な点が多い。本実験において、イネもみ枯細菌病がポリガラクトナーゼ (PG) を *in vivo* 並びに *in vitro* で産生することが明らかとなった。本酵素は *in vitro* では病原性の有無に関係なく全ての細菌株が産生するが、ジャガイモ塊茎では、腐敗能を有する細菌株においてのみその産生が認められる。ジャガイモ塊茎腐敗能とイネ幼苗腐敗能との間には極めて高い相関が存在することより¹²⁾、本菌の産生する PG が腐敗症発現に深く関与しているものと推察される。しかしながら、非病原性菌株が *in vitro* で産生する PG の植物組織に与える影響については現在のところ明らかではない。

植物病原細菌の産生する細胞壁分解酵素は病原体の宿主植物への侵入を容易にするのみでなく、細胞壁構成多糖をエネルギー源として利用できる形に切斷する可能性があると考えられる。実際イネもみ枯細菌病は D-ガラクトン酸を単一炭素源として利用できるため、PG 産生能は病原細菌が細胞間隙中で増殖するのに有利であるとされる。

本研究の結果より、イネもみ枯細菌病は少なくとも二種類の PG を産生することが明らかとなった。今後はこれら酵素が植物との相互作用においてどのような役割を担っているのかを解明する予定である。

引用文献

- 1) 飯山和弘・古屋成人・高浪洋一・松山宣明(1994)日植病報 60: 370(講要).
- 2) Iiyama, K., Furuya, N., Hara, K., Nakashima, N., Takanami, Y. and Matsuyama, N. (1994) J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 38: 175-181
- 3) Iiyama, K., Furuya, N., Takanami, Y. and Matsuyama, N. (1995) 日植病報 61: 470-476.
- 4) 藤井 溥・植松 勉(1976)植物防疫 30: 13-16.
- 5) Kotoujansky, A., Diolez, A., Boccara, M., Bertheau, Y., Andro, T. and Coleno, A. (1985) EMBO J. 4: 781-785.
- 6) Ried, J. L. and Collmer, A. (1985) Appl. Environ. Microbiol. 50: 615-622.
- 7) 佐藤善司・小磯邦子・岩崎成夫・松田 泉・白田 昭(1989)日植病報 55: 353-356.
- 8) Suzuki, F., Zhu, Y., Sawada, H. and Matsuda, I. (1998) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 75-79.
- 9) 植松 勉・吉村大郎・西山幸司・茨木忠夫・藤井 溥(1976a)日植病報 42: 310-312.
- 10) 植松 勉・吉村大郎・西山幸司・茨木忠夫・藤井 溥(1976b)日植病報 42: 464-471.
- 11) Van Gijsegem, F., Toussaint, A. and Schoonejans, E. (1985) EMBO J. 4: 787-792.
- 12) 藤本

哲・古屋成人・佐藤公治・山口純一郎・平八重一之・松山宣明
(1985) 九病虫研報 31 : 226 (講要)。 13) YONEYAMA, K.,
KONO, Y., YAMAGUCHI, I., HORIKOSHI, M. and HIROOKA, T.

(1998) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64 : 91-96.

(1998年5月1日 受領)