新しい生理活性物質コロナチンを産生する細菌の種類

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	西山,幸司 江塚,昭典
発行元	日本植物病理學會
巻/号	44巻2号
掲載ページ	p. 179-183
発行年月	1978年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

日植病報 44：179-183 (1978)
Ann. Phytopath. Soc. Japan 44：179-183 (1978)

新しい生理活性物質コロナチンを産生する細菌の種類

西山幸司*・江塚昭典*

Koushi NISHIYAMA and Akinori EZUKA : Species of Bacteria Producing Coronatine, a New Physiologically Active Substance

Abstract

Eighty species of bacteria belonging to eleven genera, about half of which were plant pathogenic, were tested for their ability to produce coronatine, a new physiologically active substance reported previously to be produced by *Pseudomonas coronafaciens* var. *atropurpurea*. Other than this bacterium, only two *Pseudomonas* species, *P. morsprunorum* and *P. maculicola*, were found to produce coronatine.

Mutants of *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* lacking the ability of producing coronatine, which were obtained during successive cultures of a virulent wild strain, were not pathogenic on Italian ryegrass, the host plant of the bacterium. Considering the fact that coronatine is a phytotoxic substance, this substance should be indispensable for developing symptoms of halo blight. Coronatine, however, would not be the sole substance governing the mechanism of pathogenicity in *P. coronafaciens* var. *atropurpurea*, because *P. morsprunorum* and *P. maculicola* were not pathogenic on Italian ryegrass although they produce coronatine.

(Received January 30, 1978)

緒　言

ライグラス類かさ枯病細菌 *Pseudomonas coronafaciens* var. *atropurpurea* (Reddy *et* Godkin) Stapp は，既報[6] のとおり，ジャガイモ塊茎柔組織の細胞を肥大させる生理活性を有する。この生理活性は同細菌が産生する新規の化合物によって起こることが判明したので，この化合物をコロナチンと命名した[2,3]。コロナチンは同細菌の培養液中に産生されるだけでなく，かさ枯病に罹病したイタリアンライグラスの葉からも分離された[5]。さらに，コロナチンの希薄溶液をイタリアンライグラスの葉身に作用させると，かさ枯病の病斑に類似した薬斑が生じた[4]。これらのことから，コロナチンはライグラス類かさ枯病細菌が産生する vivotoxin で，病徴発現になんらかの形で直接関与している可能性が考えられる。

本報では，コロナチンの産生がライグラス類かさ枯病細菌だけに特有な性質であるかどうかを知るために，できるだけ多くの種類の細菌を供試してコロナチン産生の有無を調べた。

本研究を実施するに当り，農業技術研究所植松勉技官には供試細菌の収集に御協力頂いた。野菜試験場盛岡支場渡辺康正博士，梅川学技官，兵庫県農業総合センター西村十郎技師，および静岡県農業試験場伊豆分場太田光輝技師からは供試細菌を分譲して頂いた。北海道大学農学部坂村貞雄教授，市原耿民助教授，および白石久二雄氏にはコロナチンの標準試料の分譲ならびに筆者らが単離したコロナチンの同定に御協力頂いた。また，農業技術研究所故水上武幸博士および酒井隆太郎博士には終始懇切な御指導と御助言を頂いた。ここに記して厚くお礼申し上げる。

実験材料および方法

供試細菌　ライグラス類かさ枯病細菌64菌株を含む11属80種266菌株を供試した。このうち5属43種226菌株は植物病原細菌である。供試細菌の学名は下記のとおりで，かっこ内には供試菌株数を示した。また，農業技術研究所病理科保存菌株[8] には菌株番号を，他の微生物保存機関から分譲された菌株には保存機関の略号と菌株番号とを付記した。用いた略号は，IAM

* 農業技術研究所 National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, Japan.

(東京大学応用微生物研究所), IFO (発酵研究所), AHU (北海道大学農学部), NCPPB** (National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, England) である。細菌の学名は，分譲された菌株については受領時に付されていた学名により，農業技術研究所病理科保存菌株[8]および筆者らが同定した菌株については原則として Bergey's Manual 第7版[1]に従った。

Agrobacterium tumefaciens (9) A2-1-1
Azotobacter indicus (1)
Bacillus cereus (1) B1-1-1, *B. megaterium* (1) IAM 1166, *B. polymyxa* (1) IAM 1189, *B. subtilis* (1) B1-3-4
Corynebacterium fascians (1) IAM 1079, *C. michiganense* (5) C1-1-8, *C. rathayi* (1) C1-2-1, *C. sepedonicum* (1) C1-3-1
Enterobacter aerogenes (1) A1-1-1
Erwinia aroideae (8), *E. atroseptica* (1) NCPPB 549, *E. carotovora* (6), *E. chrysanthemi* (1), *E. milletiae* (1)
Escherichia coli (1)
Pseudomonas aeruginosa (1) P1-1-2, *P. alboprecipitans* (5) P1-17-5, P1-17-7, *P. andropogonis* (6) P1-2-2, P1-2-3, P1-2-4, *P. aptata* (7) P1-3-2, P1-3-5, P1-3-9, NCPPB 871, *P. aureofaciens* (1) IAM 1001, *P. azotoformans* (1) IAM 1603, *P. caryophylli* (1), *P. cichorii* (2), *P. coronafaciens* (16) P1-5-1, P1-5-3, *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* (64) P1-6-1, P1-6-2, P1-6-3, *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* Cor⁻ (4) (Cor⁻ は変異株であることを示す), *P. cruciviae* (1) IAM 1048, *P. desmolytica* (1) IAM 1508, *P. diminuta* (1) IAM 1513, *P. eriobotryae* (1) P1-7-2, *P. fluorescens* (3) P1-8-1, P1-8-2, *P. fluva* (1) IAM 1529, *P. fragi* (1) IAM 1650, *P. glumae* (2) P1-22-1, *P. graveolens* (1) IAM 1653, *P. iodinum* (1) IFO 3558, *P. jaegeri* (1) IAM 1008, *P. lachrymans* (11) P1-9-1, *P. lapsa* (9), *P. maculicola* (2), *P. marginalis* (4), *P. marginata* (1) P1-10-1, *P. melanogenum* (1) IAM 1554, *P. mildenbergii* (1) IAM 1505, *P. mori* (2) P1-11-1, *P. morsprunorum* (1) NCPPB 330, *P. myxogenes* (1) IAM 1052, *P. oryzicola* (1), *P. ovalis* (1) P1-12-1, *P. pavonacea* (1) IAM 1155, *P. perlurida* (1) P1-13-2, *P. phaseolicola* (1) P1-14-1, *P. polycolor* (1) IFO 3918, *P. putida* (1) IAM 1506, *P. putrefaciens* (1) IAM 1509, *P. rubescens* (1) IAM 1510, *P. rubrilineans* (1) NCPPB 920, *P. rugosa* (1) P1-15-1, *P. saccharophila* (1) IAM 1504, *P. schuylkilliensis* (1) P1-16-1, *P. smaragdina* (1) AHU 1479, *P. solanacearum* (3), *P. striafaciens* (4) P1-19-1, P1-19-2, P1-19-3, *P. striafaciens* var. *japonica* (7) P1-20-1, P1-20-2, *P. syncyanea* (1) IFO 3757, *P. synxantha* (1) IFO 3906, *P. syringae* (4) NCPPB 524, *P. tabaci* (4) P1-21-3, *P. vendrelli* (1) IFO 3899, *P. viridiflava* (1), *Pseudomonas* sp. (1)
Sarcina lutea (1) IAM 1099
Serratia marcescens (1)
Xanthomonas campestris (12) X1-1-1, *X. citri* (1), *X. cucurbitae* (1) X1-3-1, *X. hyacinthi* (1) X1-4-1, *X. oryzae* (1) X1-5-5, *X. pruni* (1) X1-10-1, *X. translucens* (4), *X. translucens* f. sp. *hordei* (1) X1-11-2, *X. vesicatoria* (4), *X. vitians* (1)

コロナチン産生細菌の検出　供試細菌がコロナチンを産生するか否かは，ジャガイモ塊茎組織に対する生理活性を指標とする生物検定法によった。すなわち，ジャガイモ塊茎の柔組織を2×2×0.6cmの大きさに切り，流水に30分間さらし，さらに純水を3回とりかえて洗ったのち，2×2cmの面上の4カ所に供試細菌をせん刺接種し，湿ったろ紙を敷いて湿室にしたシャーレに入れて23Cに保った。以後7日間毎日観察し，この間に接種部のジャガイモ細胞が肥大し，肉眼で認められる隆起を生じたものを陽性と判定した（第1図)。

陽性と判定された細菌については，Ichihara ら[2]の方法に従って培養液1ℓからコロナチン画分を抽出し，Nishiyama ら[5]のペーパーディスク法によりジャガイモ塊茎組織に対する生理活性を調べると共に，薄層クロマトグラフ上で標準のコロナチンと比較した。薄層はイソプロピルエーテル・酢酸(95：5，v/v)を用いて上昇法で展開し，発色剤にはアニスアルデヒド・硫酸を用いた。ただし，ライグラス類かさ枯病細

** NCPPB からの細菌の輸入は農林省指令46横植第1815号による農林大臣の許可を得た。

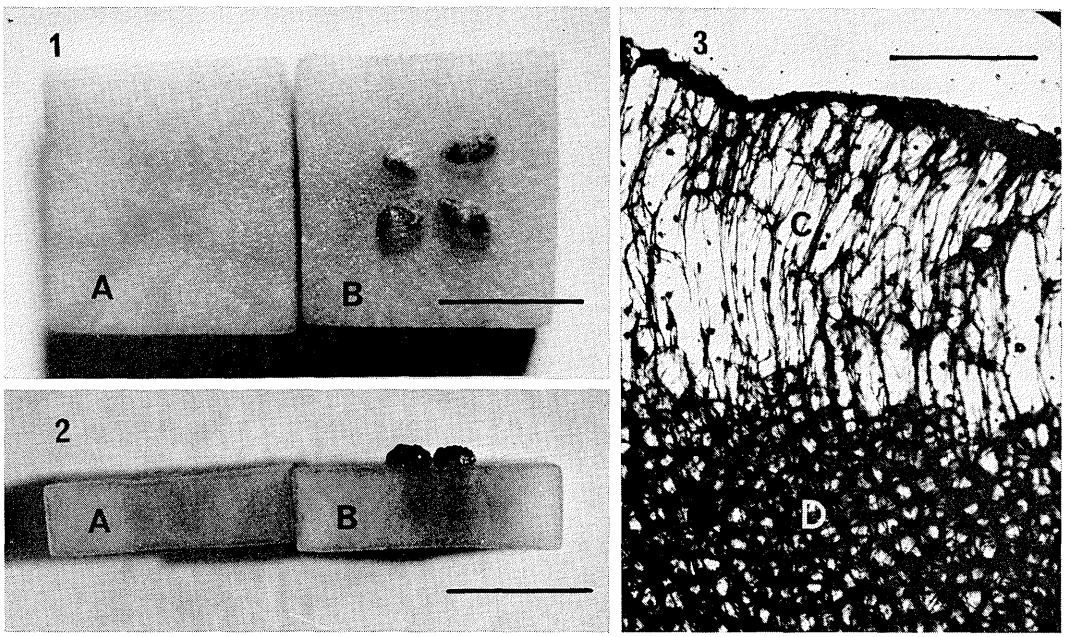

Fig. 1. Physiological activity to potato tuber.
(1) and (2) showing hypertrophic protrusions on potato tuber segments. (3) microscopic view of a longitudinal section of the protrusion.
A : negative reaction, B : positive reaction, C : expanded cells, and D : normal cells.
Bars show 10 mm in pictures (1) and (2) and 1 mm in picture (3).

菌の場合には2菌株だけをこの試験に供試した。また，比較のために *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* Cor⁻（野生株の継代培養中に得られた変異株で，ジャガイモ塊茎組織に対する生理活性を喪失した株）1菌株と *Pseudomonas* sp.（イタリアンライグラスのかさ枯病病斑から分離されたが，分離当初から病原性がない菌株）1菌株とについても，同様の抽出試験を行なった。

接種試験 以上の試験の結果生理活性が認められた細菌に対照細菌として *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* Cor⁻ 4菌株と *Pseudomonas* sp. 1菌株とを加え，イタリアンライグラスに対する病原性を調べた。試験は25Cのファイトトロン内で行ない，葉身に細菌の濃厚懸濁液を単針付傷接種し，10日間発病の有無を観察した。

実 験 結 果

コロナチン産生細菌 供試細菌266菌株のうち，ジャガイモ塊茎組織に対する生理活性が認められた細菌は，ライグラス類かさ枯病細菌64菌株と *Pseudomonas morsprunorum* Wormald 1菌株および *Pseudomonas maculicola* (McClloch) Stevens 2菌株の合計67菌株だけであった。その他の供試細菌では塊茎が腐敗するかまたは全く変化がなく，本報でいう生理活性を示さなかった。

生理活性を示した細菌の培養ろ液から抽出されたコロナチンを含むと思われる画分には，ジャガイモ塊茎組織を肥大させる作用が認められた。同画分の薄層クロマトグラフ上に現われたスポットの中には Rf 0.24 に位置するものがあり，昼光下で黄色，紫外線下で黄緑色を呈した。このスポットは，同時に展開した標準品のコロナチンのスポットと Rf 値および色調が一致したので，コロナチンであると考えられる。この試験で比較に用いた *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* Cor⁻ と *Pseudomonas* sp. とからはコロナチンが検出されなかった。この結果から，ジャガイモ塊茎組織に対する生理活性は細菌がコロナチンを産生したために起きたと考えられる。

接種試験 イタリアンライグラスに対する病原性を調べた細菌のうち，病原性が認められたものはライグラス類かさ枯病細菌64菌株だけであった。その病徴は富永[7]の記載とよく一致した。他の細菌では，傷のま

わりがごくわずかに褐変するかまたは変化せず，病原性は認められなかった。

生理活性と病原性との関係　イタリアンライグラスに対する病原性を調べた細菌について，生理活性およびコロナチン産生と病原性との関係をまとめて示すと第1表のようになる。生理活性の有無とコロナチン産生の有無とはよく一致した。しかし，それらとイタリアンライグラスに対する病原性の有無とは必ずしも一致しなかった。すなわち，ライグラス類かさ枯病細菌では生理活性と病原性とが共に陽性であったが，*P. morsprunorum* と *P. maculicola* とでは生理活性は陽性，病原性は陰性であった。対照細菌の *P. coronafaciens* var. *atropurpurea* Cor⁻ と *Pseudomonas* sp. とは生理活性，コロナチンの産生および病原性のいずれもが陰性であった。

Table 1. Relation among physiological activity to potato tuber, production of coronatine and pathogenicity on Italian ryegrass

Bacterium	No. of isolates	Potato test	Coronatine	Pathogenicity
Pseudomonas coronafaciens var. *atropurpurea*				
Wild strain	2	+	+	+
Ditto	62	+	NT	+
Cor⁻ [a]	1	−	−	−
Ditto	3	−	NT	−
Pseudomonas morsprunorum	1	+	+	−
Pseudomonas maculicola	2	+	+	−
Pseudomonas sp. [b]	1	−	−	−

+ : positive,　− : negative,　NT : not tested.
a) Mutants obtained during successive cultures of a wild strain.
b) Non-pathogenic strain isolated from a halo blight lesion of Italian ryegrass

考　　察

11属80種の細菌について，コロナチン産生の有無をジャガイモ塊茎組織に対する生理活性を指標にして調べたところ，ライグラス類かさ枯病細菌，*P. morsprunorum* および *P. maculicola* がコロナチンを産生することが明らかになった。したがって，コロナチンの産生はライグラス類かさ枯病細菌だけに特有な性質とはいえないが，産生細菌が多数の供試細菌のうちの一部であることから，この性質は細菌の種に対する特異性が高いといえるであろう。

ライグラス類かさ枯病細菌64菌株では，生理活性とイタリアンライグラスに対する病原性とが共に陽性であった。そして，同菌のコロナチン非産生変異株には病原性がなく，イタリアンライグラスかさ枯病病斑から分離された非病原性菌株（*Pseudomonas* sp.）にはコロナチン産生能がなかった。なお，この非病原性菌株の細菌学的性質はライグラス類かさ枯病細菌のそれとほとんど変りがない（未発表）。この結果とコロナチンが罹病植物からも検出される植物毒であること[4,5]とを総合すると，コロナチンはライグラス類かさ枯病細菌の病原性の有無を決定する場で直接作用している物質であろうと考えられる。

本実験で，ライグラス類かさ枯病細菌のほかにもコロナチンを産生する2種の細菌が新たに発見されたが，それらはイタリアンライグラスに病原性を示さなかった。この結果から，コロナチンはライグラス類かさ枯病細菌の病原性を決定する物質のうちの一つではあるが，おそらく病徴発現だけに関与するものであって，宿主選択性は別の機構によるのではないかと推定される。いずれにしても，ライグラス類かさ枯病細菌の病原性の機作をコロナチンだけで説明することはできない。

なお，*P. morsprunorum* および *P. maculicola* の病原性におけるコロナチンの役割についてはまだ検討されておらず不明である。

摘　　要

植物病原細菌5属43種を含む11属80種の細菌について，新しい生理活性物質コロナチンの産生の有無を調

査した。その結果，コロナチンを産生する細菌として，既知のライグラス類かさ枯病細菌 *Pseudomonas coronafaciens* var. *atropurpurea* のほかに，新たに2種の細菌 *P. morsprunorum* と *P. maculicola* とが見出された。

ライグラス類かさ枯病細菌の培養中に生じたコロナチン非産生変異株には病原性がなかった。コロナチンが植物毒であることを考慮すると，ライグラス類かさ枯病の病徴発現にはコロナチンが必要と考えられる。しかしながら，コロナチンを産生する他の2種の細菌はイタリアンライグラスに病原性を示さないので，ライグラス類かさ枯病細菌の病原性の機作をコロナチンだけによって説明することはできない。

引用文献

1. Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R. (1957). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed. 1094pp. The Williams & Wilkins Co., Bartimore.
2. 市原耿民・白石久二雄・小笠原恵美・佐藤博二・坂村貞雄・西山幸司・酒井隆太郎 (1975). 第19回天然有機化合物討論会講演要旨集 pp. 263-268.
3. Ichihara, A., Shiraishi, K., Sato, H., Sakamura, S., Nishiyama, K., Sakai, R., Furusaki, A. and Matsumoto, T. (1977). J. Amer. Chem. Soc. 99 : 636.
4. Nishiyama, K., Sakai, R., Ezuka, A., Ichihara, A., Shiraishi, K., Ogasawara, M., Sato, H. and Sakamura, S. (1976). Ann Phytopath. Soc. Japan 42 : 613-614.
5. Nishiyama, K., Sakai, R., Ezuka, A., Ichihara, A., Shiraishi, K. and Sakamura, S. (1977). *Ibid.* 43 : 219-220.
6. 西山幸司・富永時任 (1973). 同上 39 : 236 (講要).
7. 富永時任 (1968). 同上 34 : 242-249.
8. Tominaga, T., Nishiyama, K., Wakimoto, S. and Uematsu, T. (1968). Catalogue of Cultures. The National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo, 43pp.