

令和元年6月26日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07621

研究課題名(和文) イネ白葉枯病菌の病原性関連遺伝子群hrpにおける糖依存的な新規発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on sugar-dependent expression of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* hrp genes

研究代表者

津下 誠治 (Tsuge, Seiji)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10254319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イネ白葉枯病菌のhrp遺伝子群は、宿主防御応答の抑制に関わり、病原性に必須である。本研究では、hrp遺伝子群の発現をキシロース依存的に誘導する機構とそれを制御する因子XyIRを明らかにした。XyIRは転写抑制因子であり、標的遺伝子のプロモーター領域に結合することでその転写を抑制するが、キシロース存在下ではその抑制機能が失われ、標的遺伝子の転写が可能になる。XyIRの標的遺伝子には、キシラン/キシロース代謝関連遺伝子も含まれており、白葉枯病菌はイネへの感染過程においてキシロースを栄養源とすると同時に、宿主防御応答の抑制に関わるhrp遺伝子群の誘導因子としても利用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白葉枯病菌は、熱帯アジアを中心に世界の稲作地帯で甚大な被害をもたらすイネの重要病原細菌である。本細菌のhrp遺伝子群については、その病原性への重要性から世界の多くの科学者が研究対象としている。とくに感染特異的な本遺伝子群の発現制御機構の解明に向けた研究が精力的に行われているが、その全貌は未だ明らかでない。本研究では、その中でもとくに、キシロース依存的な発現制御機構とそれに関わる制御因子について新知見を得ることができた。本研究で得られた知見は、hrp遺伝子群の発現阻害をターゲットとした本病原細菌防除資材開発等に応用可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：hrp genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the pathogen of bacterial leaf blight of rice, are involved in suppression of host defense responses and are essential for virulence. In this study, I studied on the mechanism of the xylose-dependent expression of the hrp genes and identified the novel regulator XyIR that controls it. XyIR is found to function as a transcriptional repressor. It suppresses the transcription of target genes by binding to the promoter region of target genes, but in the presence of xylose, its repressing function is lost, which activates transcription of the genes. The targets of XyIR also include xylan / xylose metabolism-related genes. The findings in this study suggest that, during the infection process, *X. oryzae* pv. *oryzae* uses xylose not only as a nutrient source but also as an inducer of hrp genes.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ白葉枯病菌 hrp遺伝子 遺伝子発現 キシロース

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

イネ白葉枯病菌をはじめとする多くの植物病原細菌において、*hrp* 遺伝子群は病原性に必須である (Alfano and Collmer 1997)。*hrp* 遺伝子群は、タイプ III タンパク質分泌装置の構成成分をコードしており、本装置を介して細菌は多数のタンパク質（エフェクター）を植物細胞内に直接分泌する。これらのエフェクターが植物の防御応答を抑制・攪乱することで、細菌の植物体内における定着・増殖が可能となる。*hrp* 遺伝子群は感染時に特異的に発現し、一般に用いられる培地上ではその発現が見られない。白葉枯病菌では、HrpG および HrpX と呼ばれる 2 つのタンパク質が *hrp* 遺伝子群の発現制御の鍵となる因子として機能している (Büttner and Bonas 2010)。感染時には、HrpG が未知の環境（植物）シグナルを受容することで活性化し、*hrpX* の発現を誘導した後、HrpX が他の *hrp* 遺伝子群の発現を制御することが知られていた。また、筆者や他の研究者により、これら以外にも *hrp* 遺伝子群の発現制御に関わる因子が次々と報告されてきており、本遺伝子群の発現は、多数の因子の介在する複雑なネットワークにより制御されていると予想されていた。

## 2. 研究の目的

筆者は、白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現制御機構を解明するためのツールとして、本遺伝子群の発現を可能にする培地(XOM2 培地)を開発して既に報告していた (Tsuge et al. 2001)。本培地の開発にあたり、糖源としてキシロースを加えることで白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現が誘導されること、さらに、キシロース存在下では *hrp* 制御因子の 1 つである HrpX の蓄積が増加することを明らかにしていた (Ikawa et al. 2016)。白葉枯病菌が宿主とするイネは、その細胞壁に多量のキシラン（キシロースの重合体）を含むことから (Takeuchi et al. 1994)、本細菌がキシロースを *hrp* 遺伝子群の発現誘導因子として利用することはきわめて合理的なことであるとも考えられる。筆者は、白葉枯病菌の最も重要な病原性因子の 1 つである *hrp* 遺伝子群の発現制御機構の全貌を明らかにすべく研究を行ってきた。本研究はその一環として、とくに、キシロースを介した白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現制御機構に焦点をあて、その機構解明を目的として実施した。

## 3. 研究の方法

- (1) ランダムトランスポゾン挿入法によりキシロースの有無にかかわらず *hrp* 遺伝子群の発現を行う変異株を得る。
- (2) トランスポゾンの挿入により破壊された遺伝子を特定した後、同遺伝子の欠損変異株を作出し、*hrp* 遺伝子群の発現制御への同遺伝子の関与を明らかにする。
- (3) 既知タンパク質との相同性および機能領域の検索により XylR の機能を推定し、その検証を行う。
- (5) キシロースとその代謝産物のいずれが *hrp* 遺伝子群の発現誘導因子として機能するかを明らかにするため、キシロース代謝に関わる遺伝子についての変異株を作出し、*hrp* 遺伝子群の発現を調べる。

## 4. 研究成果

- (1) 白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子の 1 つである *hpa1* のプロモーター下流に発光遺伝子群(*lux*)を導入した菌株は、キシロースを唯一の糖源とする培地 XOM2 で強い発光を生じる一方で、キシロースをグルコースに置換した培地ではその発光が著しく弱くなる。本菌株を親株としたランダムトランスポゾン法によって得られた変異株のうち 1 つは、その糖源がグルコースの場合も強い発光が見られた。本変異株では、遺伝子番号 XOO\_4161 がトランスポゾン挿入により破壊されていることがわかった。データベースを用いた相同性検索および機能領域の検索により、XOO\_4161 は LacI 型の転写制御因子の 1 つである XylR であると予想された。
- (2) XylR 欠損株を作出し、GUS レポーターシステムにより *hrp* 制御遺伝子である *hrpG* と *hrpX*、および HrpX に制御される *hrpB1* と *hrcU* の発現をキシロース存在下/非存在下で調べた。その結果、*hrpG* と *hrpX* については、野生株と同様、キシロース非依存的な発現が見られた。一方、*hrpB1* と *hrcU* については、野生株においてキシロース非存在下で著しい発現の低下が見られたにもかかわらず、XylR 欠損株ではキシロース存在下と同様にこれらの遺伝子が発現することがわかった (図 1)。このことは qRT-PCR を用いたこれらの遺伝子の転写産物の蓄積解析によっても確認できた。さらに、XylR 欠損株と野生株をキシロース存在下/非存在下で培養後、HrpX の蓄積をウェスタンブロット法により解析したところ、野生株ではキシロース非存在下における HrpX の蓄積が減少していたにもかかわらず、XylR 欠損株ではキシロースの有無にかかわらず同程度の HrpX が蓄積していることがわかった (図 2)。以上のことから、キシロースの有無にかかわらず *hrpX* の発現は同程度に行われるが、その後、キシロース非存在下では HrpX の蓄積が抑制されるにもかかわらず、キシロースではその抑制が解除され、HrpX が安定的に蓄積することで、*hrpB1* や *hrcU* をはじめとする *hrp* 遺伝子群の発現が誘導されること、および HrpX の蓄積抑制に XylR が関与していることが示唆された。つまり、XylR は *hrp* 遺伝子群の発現の負の制御因子として機能しており、キシロース存在下では本因子による制御が無効化されると考えられた。
- (3) 異なる糖条件における *xylR* の発現を調べたところ、本遺伝子はキシロースの有無にかかわ

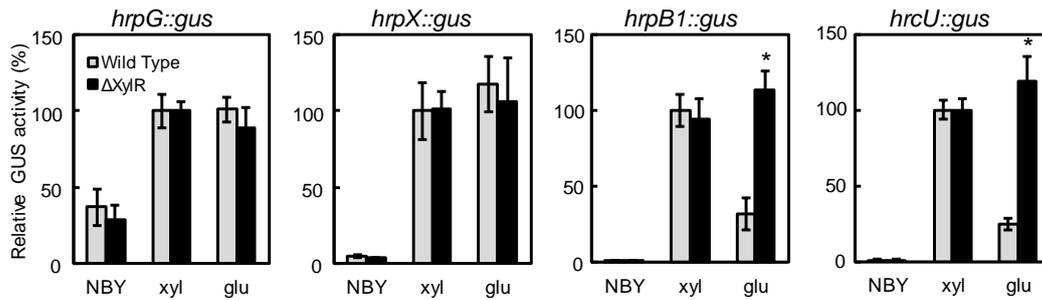


図 1. 野生株 (Wild Type) と XylR 欠損変異株 ( $\Delta$ XylR) のキシロース存在下 (xyl) およびキシロース非存在下 (グルコース存在下: glu) における各 *hrp* 遺伝子の発現を GUS レポーターにより調べた。NBY は *hrp* 非誘導培地。 *hrpG* と *hrpX* は *hrp* 制御遺伝子であり、 *hrpB1* と *hrcU* は HrpX に制御される遺伝子である。

らず同程度の発現していることがわかった。

(4) XylR は他の多くの細菌でも保存されており、これがキシラン/キシロース代謝関連遺伝子群の発現を制御しているとの報告もある (Stephens et al. 2007)。またその制御においては、キシロース非存在下では XylR がターゲット遺伝子のプロモーター領域に存在するシス配列 (TGTTAGCGCTACCA) に結合し、その転写を阻害するが、キシロース存在下では、XylR のシス配列からの解離が起こり、ターゲット遺伝子の転写が促進されることも報告されている。白葉枯病菌のゲノム中

では、 *xylR* の隣にキシロースイソメラーゼ遺伝子 (*xylA2*) が存在しており、この遺伝子のプロモーター領域には、XylR のターゲットと予想される配列 (TGGTAGCGCTAACA) が存在する。なお、キシロースイソメラーゼはキシロース代謝の第 1 段階であるキシロースのキシロースへの変換を触媒する酵素である。白葉枯病菌の XylR が他の細菌の XylR と同様の機能をもつかどうかについて、 *xylA2* の発現制御を解析することでその検証を行った。

野生株において、 *xylA2* はキシロース存在下で特異的に発現していたが、XylR 欠損変異株における本遺伝子の発現にキシロース依存性は見られなかった (図 3)。また、大腸菌のタンパク質発現系を用いて XylR を調整し、 *xylA2* のプロモーター領域中にある推定シス配列への結合を調べたところ、本タンパク質は、野生型の同配列をもつ DNA 断片には結合するが、そこに塩基置換を導入した場合、その結合が見られなくなることがわかった (図 4)。また、白葉枯病菌のゲノム中には、同様のシス配列をもつ遺伝子が *xylA2* 以外に 5 つ存在するが、いずれも *xylA2* と同様に、キシロースおよび XylR に依存した制御を受けていることが確認された。以上のことから、XylR は他の細菌で報告されているように、キシロース非存在下でターゲット遺伝子のプロモーター領域に存在するシス配列に結合することによりその遺伝子発現を抑制するが、キシロース存在下ではそこからの解離により、ターゲット遺伝子の転写・発現を可能にすることが示唆された。

(5) イネ白葉枯病菌のゲノム中にはキシロースイソメラーゼ遺伝子が 2 つある (*xylA1*、 *xylA2*)。両者は 100% の相同性をもつが、そのプロモーター領域の配列が異なっている。先述のように、 *xylA2* は XylR の結合するシス配列をもつことでその制御を受けるが、一方、 *xylA1* に同様の配列は無く、キシロースおよび XylR の有無にかかわらず

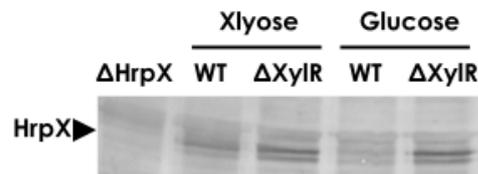


図 2. 野生株 (WT) および XylR 変異株 ( $\Delta$ XylR) のキシロース存在下およびキシロース非存在下 (グルコース存在下) における HrpX の蓄積。  
 $\Delta$ HrpX は HrpX 欠損変異株。

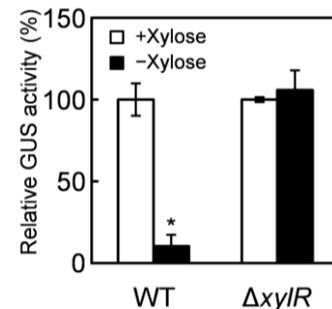


図 3. 野生株 (WT) および XylR 変異株 ( $\Delta$ *xylR*) のキシロース存在下およびキシロース非存在下 (グルコース存在下) における *xylA2* の発現。 *xylA2::gus* 融合遺伝子をもつプラスミドで形質転換された両菌株を培養後、GUS 活性を測定した。

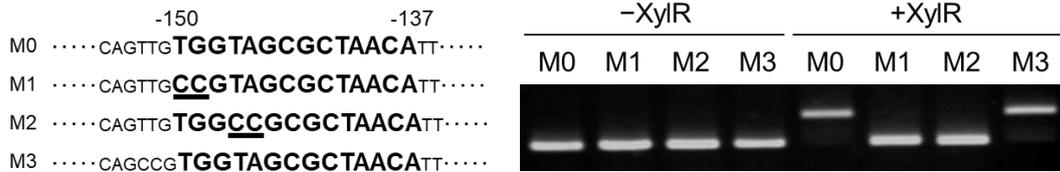


図 4. *xylA2* 上流のプロモーター領域にある XylIR ターゲット配列 (太字) に塩基置換を導入し、XylIR の結合を調べた。塩基置換をもたない (M0)、ターゲット配列の外側に塩基置換を導入した (M3) 場合、それを含む DNA 断片は XylIR との結合により、電気泳動時の泳動度の遅延が見られるが、ターゲット配列に塩基置換を導入した場合 (M1、M2)、その結合による泳動度の遅延は見られない。

同程度の発現が見られた。また、*xylA2* 欠損株は、キシロースを唯一の糖源とする培地で野生株と同程度の増殖を示したが、*xylA1* 欠損株は同培地での増殖が著しく低下した。これらの結果から、2つのキシロースイソメラーゼのうち恒常的に生産される XylA1 が主としてキシロース代謝を担っているが、キシロース存在下では、XylR による抑制が解除されることにより XylA2 も併せて生産され、また、同時にキシロースの重合体であるキシランの分解に関与する酵素等の生産も活性化することで、より効率的なキシロースの利用が行われると考えられた。

(6) イネ白葉枯病菌の細胞内で、キシロースはキシルロース、そしてキシルロース 5 リン酸を介した後、ペントースリン酸経路、そして解糖系へと代謝されると考えられる。XylR 依存的な *hrp* 遺伝子群の制御に関わる因子がキシロースか、あるいはキシロースの代謝産物であるかを調べるために、キシロースからキシルロースへの変換を担うキシルロースイソメラーゼ、およびキシルロースからキシルロース 5 リン酸への変換を担うキシルロカイネースを欠損した変異株を作成した。これらの変異株における *hrp* 遺伝子群、および *xylA2* の発現は野生株と同様であったことから、XylR を介した発現制御にはキシロースの代謝産物ではなく、キシロース自体が関与することが示唆された。

(7) 機能領域検索の結果、XylR は DNA 結合領域とキシロースが結合すると考えられるリガンド結合領域から構成されると予想された。そして、キシロース非存在下では、その DNA 結合領域によりターゲットとなるシス配列に結合して下流の遺伝子の転写を抑制するが、キシロース存在下ではリガンド結合領域にキシロースが結合することでシス配列からの XylR の解離が起こり、その結果、遺伝子の転写が可能になると考えられた。そこで、リガンド結合領域に 1 アミノ酸置換を導入した変異株を作成し、*hrp* 遺伝子群、および *xylA2* の発現を調べた。その結果、本変異株では、これらの遺伝子発現が野生株と比較し、著しく抑制されていた。この結果は、リガンド結合領域へのキシロースの結合が起こらないため、XylR のシス配列からの離脱が起こらず、その下流の遺伝子発現が抑制されたままになるためであると考えられる。また、このことは、XylR が *hrp* 遺伝子群の発現を負に制御しており、この制御がキシロース存在下で無効化されるという上記の結果と一致するものである。また、本変異株はイネへの病原力が低下することも確認できた。

以上、本研究により、イネ白葉枯病菌において XylR は *hrp* 制御因子の 1 つである HrpX の蓄積制御を介して、*hrp* 遺伝子群の発現を負に制御することが明らかとなった。また、XylR は同時にキシロースイソメラーゼ遺伝子 *xylA2* をはじめとするキシラン/キシロース代謝関連遺伝子の負の制御因子としても機能していること、そしてそれらの負の制御がキシロースにより解除されることが示された (図 5)。先述のように、イネの細胞壁には多量のキシロースが含まれることが報告されている。また、本細菌の生存場所である導管は、きわめて栄養が乏しいことも知られている。白葉枯病菌はイネ葉への侵入後、わずかに存在する遊離キシロース、あるいは自らの分泌するキシラ

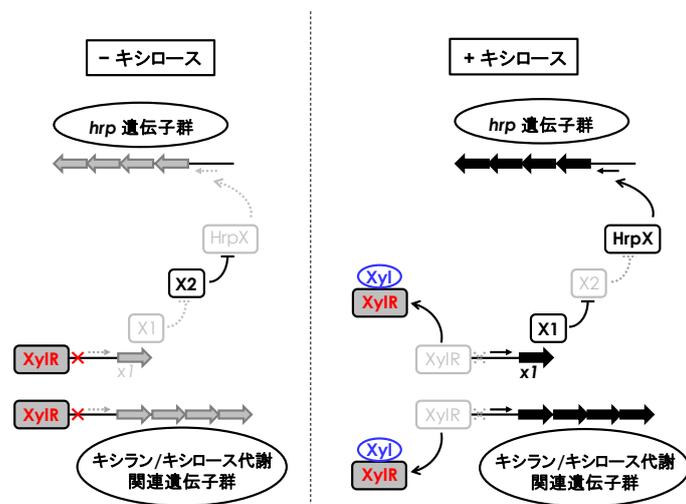


図 5. キシロースと XylR を介した *hrp* 遺伝子群とキシラン/キシロース代謝関連遺伝子群の発現制御モデル

ナーゼにより分解することで得るキシロースにより XylR を不活化することで、キシロースをより効率的に栄養源として利用すると同時に、*hrp* 遺伝子群の発現を誘導することで宿主の防御応答を抑制すると考えられる。そして、これらが本細菌のイネ葉内での生存・増殖と感染を成立させるうえで重要な一要因であることが示唆された。

一方、XylR による HrpX の蓄積抑制に関しては、XylR がその発現を直接抑制する因子、およびそれによりその発現あるいは機能を抑制され、直接 HrpX の蓄積抑制に関わる因子の少なくとも 2 つの因子 (図 5 の X1 および X2) の介在が予想される。それらについてはこれまでのところ同定に至っておらず、今後の課題として現在その探索を続けている。また、同未知因子の探索を行う際に、本来の目的とは異なるが、*hrpX* の発現を制御する因子である HrpG の発現を負に制御する新規因子として XOO\_0590 を同定することができた。本因子は窒素飢餓条件下で強く発現誘導されることも明らかにしており、今後本因子の *hrpG* 発現制御機構の解明も併せて実施していきたいと考えている。

#### <引用文献>

- ① Alfano, J.R. and Collmer, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 1997. 179:5655-5662.
- ② Büttner, D. and Bonas, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. 34:107-133.
- ③ Ikawa, Y. and Tsuge, S. The quantitative regulation of the *hrp* regulator HrpX is involved in sugar-source-dependent *hrp* gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016. 363:fnw071.
- ④ Stephens, C., Christen, B., Watanabe, K., Fuchs, T. and Jenal, U. Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. *J. Bacteriol.* 2007. 189:8828-8834.
- ⑤ Takeuchi, Y., Tohbaru, M. and Sato, A. Polysaccharides in primary cell walls of rice cells in suspension culture. *Phytochemistry* 1994. 35:361-363.
- ⑥ Tsuge, S., Furutani, A., Fukunaka, R., Kubo, Y., and Horino, O. Growth complementation of *hrpXo* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by virulent strains in rice cultivars resistant and susceptible to the parental strain. *J. Gen. Plant Pathol.* 2001. 67:51-57.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yumi Ikawa, Sayaka Ohnishi, Akiko Shoji, Ayako Furutani and Seiji Tsuge Concomitant regulation by a LacI-type transcriptional repressor XylR on genes involved in xylan and xylose metabolism and the type III secretion system in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2018. 31: 605-613. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0277-R>

[学会発表] (計 8 件)

- ① Yumi Ikawa, Sayaka Ohnishi, Akiko Shoji, Ayako Furutani and Seiji Tsuge. A novel regulatory pathway of *hrp* gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: quantitative regulation of a key *hrp* regulator HrpX by the regulator controlling xylan/xylose metabolism-related genes. 6th *Xanthomonas* Genomics Conference & 2nd Annual EuroXanth Conference. 2018 年
- ② Yumi Ikawa and Seiji Tsuge. The mechanism of xylose-dependent expression of *hrp* genes in a rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. 11th International Congress of Plant Pathology 2018 年
- ③ 伊川有美, 津下誠治. 糖を介したイネ白葉枯病菌 *hrp* 遺伝子群の発現制御. 第 28 回 植物細菌病談話会. 2018
- ④ 津下誠治, Md. Mamunur Rashid, 木村安佑, 伊川有美. イネ白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子発現を負に制御する新規転写制御因子の同定. 平成 30 年 日本植物病理学会大会 2018 年
- ⑤ 伊川有美, 津下誠治. イネ白葉枯病菌におけるキシロース代謝制御因子による III 型分泌システム構成タンパク質遺伝子の発現制御. 第 90 回 日本細菌学会総会 2017 年
- ⑥ 伊川有美, 津下誠治. イネ白葉枯病菌における type III 分泌装置構成遺伝子 *hrp* の糖依存的発現制御機構. 第 27 回 植物微生物研究会 2017 年
- ⑦ 伊川有美, 津下誠治. イネ白葉枯病菌の *hrp* 制御因子 HrpX の蓄積抑制に関与する LacI 型転写制御因子 XylR の制御様式. 平成 29 年度 日本植物病理学会大会 2017 年
- ⑧ Seiji Tsuge, Yumi Ikawa. Importance of sugar and sugar metabolisms in *hrp* gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. 5th International Conference on Bacterial Blight of Rice. 2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都府立大学植物病理学研究室 [http://www2.kpu.ac.jp/life\\_environ/plant\\_path/](http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/plant_path/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。