

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15530

研究課題名（和文）イネ白葉枯病菌の病原力遺伝子群hrpとキシロース代謝の同時制御とその意義

研究課題名（英文）Meaning of concomitant regulation of virulence genes hrp and xylose metabolism genes by the transcriptional regulator XylR in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

研究代表者

伊川 有美 (Ikawa, Yumi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・特任助教

研究者番号：30866968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：イネ白葉枯病菌の病原力には、hrp遺伝子群の発現とそれに伴う宿主防御応答の抑制に関わるタイプⅥタンパク質分泌装置が重要である。本遺伝子群はイネ細胞壁の構成成分であるキシロースを誘導因子として感染時特異的に発現する。本研究により、本細菌は恒常的にキシロースを細菌細胞内への取込む輸送システムをもつことで、感染期間を通じたhrp遺伝子群の発現とそれに伴う宿主防御応答の抑制を可能にすることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの植物病原細菌において感染時特異的に発現・機能するhrp遺伝子群は最も重要な病原力遺伝子の1つであり、細菌病防除資材開発の格好のターゲットとなり得る。しかし、その発現制御には多くの因子が介在しており、その全体像が明らかとなっているものは無い。本研究では、熱帯アジアを中心に世界の稲作地帯において最も重要な病原細菌のひとつである白葉枯病菌について、hrp遺伝子群の発現制御機構の新たなシステムとして、感染期間を通じたhrp遺伝子群の発現を可能にするための、継続的な細胞内へのキシロースの供給システムが存在することを示す結果を得た。これは、本細菌に対する新規防除資材開発につながる成果である。

研究成果の概要（英文）：For virulence of a rice pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, expression of hrp genes is important. The gene encode components of the type VI secretion system, which is an indispensable device for suppressing the host resistance is important. The expression of the genes is induced by xylose, a major component of the rice cell wall. The results of this study suggest that the bacteria possess transporter systems to permanently uptake xylose, which allows hrp gene expression to suppress host defense systems throughout the infectious period.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ白葉枯病 イネ白葉枯病菌 キシロース キシロース輸送体 キシロース代謝

1. 研究開始当初の背景

イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) は、熱帯アジアを中心に世界の稲作地帯で発生する重要病害の1つである白葉枯病の原因細菌である。本細菌は、イネ葉の葉縁の水孔や傷口から侵入し、道管で増殖することで葉枯れや萎凋といった深刻な病害を引き起こす。本病害に対して卓効を示す防除剤は未だ開発されておらず、抵抗性品種の育成と栽培が主たる防除手段であるが、その抵抗性品種を侵す新たな病原性系統の出現により、必ずしもこれが成功しているとは言えない。それゆえ、新規の防除資材・技術の開発が望まれており、そのためには白葉枯病菌の病原力機構の解明は必須である。

本細菌の病原力因子の1つは、タイプIIIタンパク質分泌装置 (T3SS) であり、本細菌はこれを介してエフェクターと呼ばれる数十種に及ぶタンパク質を直接植物細胞内に送り込む。これらのエフェクターによる宿主防御機構の抑制・攪乱、あるいは感受性に関わる植物遺伝子の発現活性化が本細菌のイネ葉内への定着・増殖を可能とする。T3SS の構築には感染特異的に発現する *hrp* と呼ばれる一連の遺伝子群が関与する。本遺伝子群の発現は、2つの制御因子 HrpG と HrpX によって制御されており、感染時特異的な *hrpG* の転写とその産物 HrpG のリン酸化、さらにリン酸化 HrpG による *hrpX* の発現と HrpX による他の *hrp* 遺伝子の発現誘導という過程がある。筆者は白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現制御系の中に HrpX の翻訳後の量的制御が存在することを見出した。また本制御機構において、LacI 型転写制御因子 XylR が HrpX の安定性 (蓄積) の抑制因子として機能すること、キシロース存在下でその抑制作用が失われること、さらに XylR はキシラン/キシロース代謝関連遺伝子群の抑制因子としての機能も持ち、その抑制作用もキシロース存在下で解除されることを明らかにしていた。しかし、キシロースおよび XylR 依存的な HrpX の翻訳後の量的制御がどのようになされているのか、その詳細は未だ明らかでなかった。

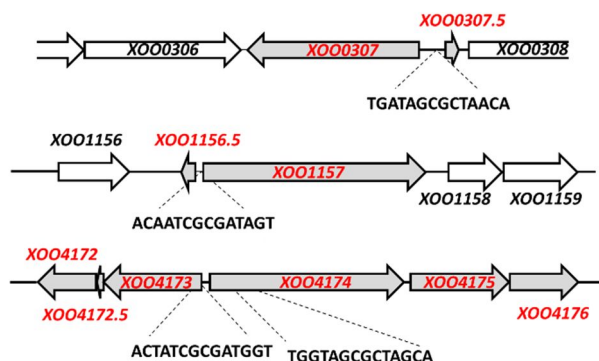
一方、T3SS を介して分泌される本細菌の TAL エフェクターが、イネのシュクロース排出ポンプ遺伝子 (*SWEET*) の発現を活性化させること、そしてそれが病原性に重要であることが明らかとなっている。このことは白葉枯病菌がイネからシュクロースを収奪し、細菌増殖のための栄養源として利用していることを示唆している。しかし、*SWEET* 遺伝子の活性化にはその前段階として、*hrp* 遺伝子群の発現にともなう T3SS の構築が必須である。イネ細胞壁には多量のキシランが含まれる。したがって筆者は、『白葉枯病菌は「感染極初期」に、まずキシランの主成分であるキシロースを栄養源として初期増殖を行うとともに *hrp* 遺伝子群の発現誘導を介した宿主防御応答の抑制・攪乱を行うことで宿主内定着を可能とし、その後イネから収奪したシュクロースを利用して爆発的に増殖する』と考えた。しかし、その実験的証明は得られておらず、宿主イネの防御応答の抑制・攪乱と感受性の増大に関わる *hrp* 遺伝子群と栄養獲得に関わるキシラン/キシロース代謝関連遺伝子群がその発現制御機構を共有する意義については不明のままであった。

2. 研究の目的

上記のような背景に基づき、(1) XylR による HrpX の翻訳後量的制御機構の解明、(2) 宿主への感染過程、とくに「感染極初期」におけるキシロース代謝の重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

XylR が制御する遺伝子は、そのプロモーター領域に XylR 結合モチーフ配列を有することから、XylR 欠損株のトランスクリプトーム解析データから遺伝子発現に変化があり、かつプロモーター領域にモチーフ配列をもつ遺伝子および遺伝子群を選抜した (第1図)。これらそれぞれの

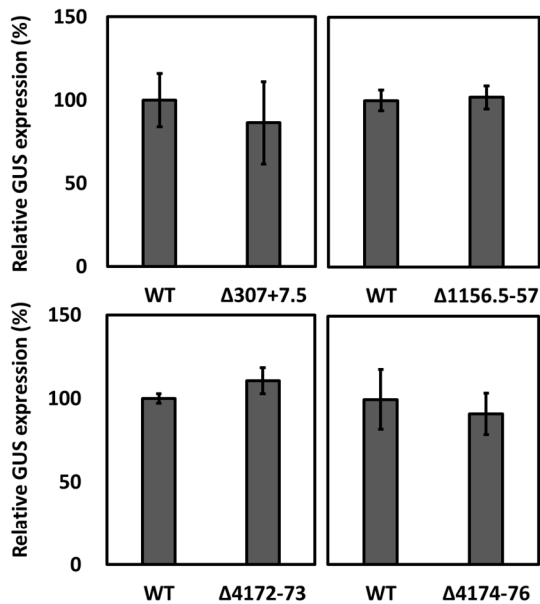


第1図 トランスクリプトーム解析とXylR結合モチーフ配列からXylRが制御すると予想された遺伝子群とその周辺遺伝子地図
赤文字がXylRが制御すると予想された遺伝子番号、アルファベットはモチーフ配列を表す。

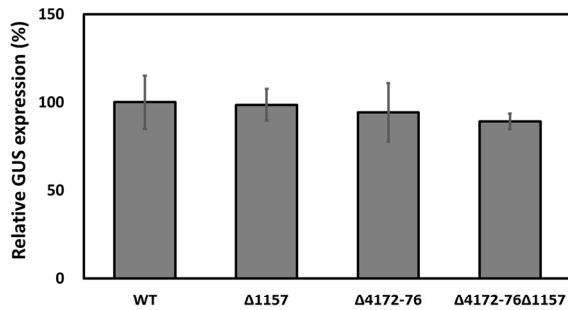
の遺伝子の欠損株やすべての遺伝子および遺伝子群を欠損させた多重欠損株を作成し、それぞれの欠損株における *hrp* 遺伝子の発現を調べた。なお、*hrp* 遺伝子の発現は、HrpX に制御される遺伝子の1つである *hrcU* あるいは *hrpB* のプロモーター領域とその下流に *b*-グルクロニダーゼ遺伝子 (*gus*) をもつプラスミドを白葉枯病菌野生株、あるいは各欠損株に導入し、これらの培養後の GUS 活性を測定することで調べた。

4. 研究成果

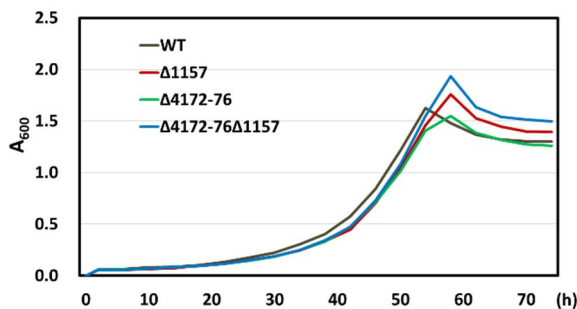
プロモーター領域に XylR 結合モチーフをもつ遺伝子および遺伝子群のそれぞれを欠損させた株を作成し、キシロ-



第2図 XylRが制御すると予想される遺伝子群多重欠損株のキシロースを糖源とする培地における hrp 遺伝子の発現 WTは野生株、 $\Delta 307+307.5$ 、 $\Delta 1157$ 、 $\Delta 4172-73$ 、 $\Delta 4174-76$ はそれぞれの遺伝子、および遺伝子群の欠損株を表す。



第3図 XylRが制御すると予想されるキシロース輸送体を含む単独および多重欠損株のキシロースを唯一の糖源とする培地における hrp 遺伝子の発現 $\Delta 1157$ (XOO_1157欠損株)、 $\Delta 4172-76$ (XOO_4172~4176欠損株) $\Delta 4172-76\Delta 1157$ (XOO_4172-76、XOO_1157欠損株)



第4図 キシロースを糖源とする培地における各輸送体多重欠損株の増殖 $\Delta 1157$ (XOO_1157欠損株)、 $\Delta 4172-76$ (XOO_4172~4176欠損株) $\Delta 4172-76\Delta 1157$ (XOO_4172-76、XOO_1157欠損株)

されず、そのため後者をもつ野生株はグルコース存在下でも hrp 遺伝子群の発現を誘導するに足る分量のキシロースが細菌細胞内に供給されるが、XylR 依存的輸送体欠損株ではそれがなされず、 hrp 遺伝子の発現が減少したと考えられた。

XylR 依存的キシロース輸送体のはたらきをグルコース以外の糖も抑制するのかについて調べるため、キシロースに、グルコース、フルクトースまたはガラクトースを加えた培地で培養し、 hrp 遺伝子の発現を調べた。その結果、 hrp 遺伝子の発現が低下したのはグルコースを加えた培地のみであった。このことから、XylR 非依存的輸送体はグルコースによってのみ、その機能が抑制されることが明らかとなった。(第6図)

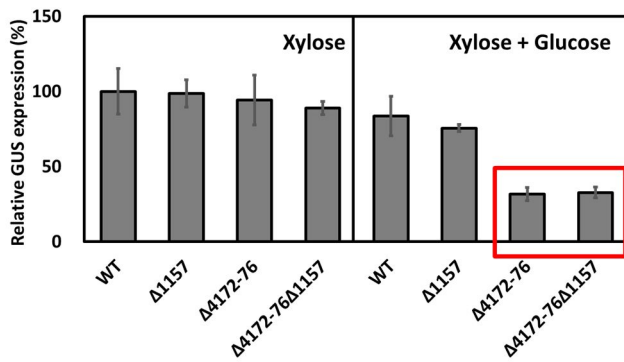
キシロースによる XylR の不活化は XylR に発現調節される遺伝子(群)の発現に必須である。それらの遺伝子(群)のプロモーターと gus 遺伝子を連結させたプラスミドを野生株に導入し、得られた形質転換体をキシロースあるいはグルコースのみを糖源とする培地、およびキシロースとグルコースを糖源とする培地で培養後、GUS 活性を測定することにより、それらの遺伝子

を単一糖源とする hrp 誘導培地で培養後、それらの hrp 遺伝子の発現を調べたところ、いずれの変異株においても、その発現に差は認められなかった(第2図)。本結果から、XylR によって発現調節される遺伝子が、直接 XylR 依存的な HrpX の蓄積制御、およびそれに伴う hrp 遺伝子群の発現制御に関わるわけではないことが示唆された。

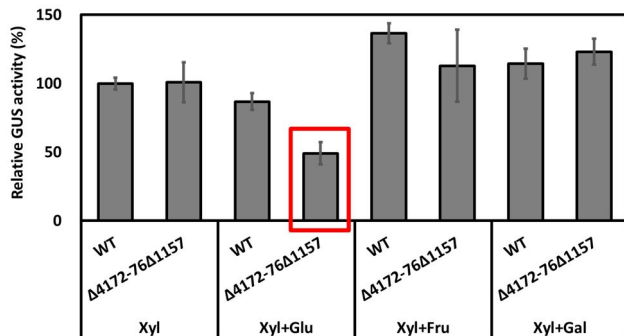
一方で、これらの遺伝子群にはキシロース輸送体をコードしていると予想される遺伝子 XOO_1157, 4173, 4174, 4175 の4つが含まれており、これらの輸送体は、それぞれ外膜に2つ、内膜に2つ存在していると予想された。このことから、これらによって細菌細胞内に取り込まれたキシロースが、何らかの経路を介して HrpX の蓄積増大とそれに伴う hrp 遺伝子群の発現活性化に関わる可能性を考えた。

そこで、これら4つのキシロース輸送体遺伝子を全て欠損させた株を作成した。しかし、本欠損株をキシロースのみを糖源とする hrp 誘導培地で培養したところ、 hrp 遺伝子の有意な発現低下は認められなかった(第3図)。一方、興味深いことに、この欠損株は、キシロースを唯一の糖源とする培地においても野生株と同程度の増殖能力を維持することがわかった(第4図)。本結果は、XylR によって制御されるキシロース輸送体以外に、XylR による制御を受けない未知のキシロース輸送体が存在し、キシロースを単一糖源とする培地においては、XylR 非依存的輸送体のはたらきによりキシロースが細胞内に取り込まれ、細菌増殖が可能になることを示している。また、その経路によって取り込まれたキシロースが HrpX の蓄積増大と hrp 遺伝子の発現および増殖が維持されているのではないかと示唆された。

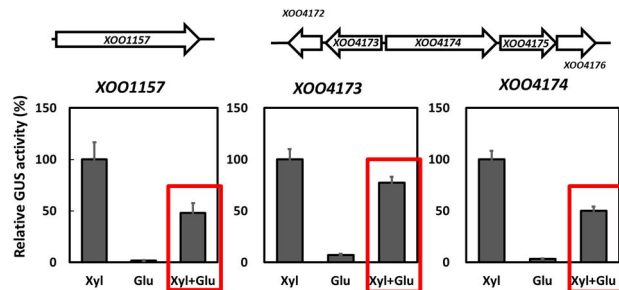
グルコース存在下では、他の糖の利用に関わる経路が抑制されることがある(カタボライトリプレッション)。そこで XylR 依存的キシロース輸送体の全てを欠損させた株をキシロースとグルコースの共存する条件下で培養し、 hrp 遺伝子の発現を調べたところ、野生株ではグルコースの有無で hrp 遺伝子発現に顕著な差は認められなかったが、輸送体欠損株においてはグルコース存在下で顕著な hrp 遺伝子の発現低下がみられた(第5図)。このことから、XylR 非依存的輸送体のはたらきは、グルコースによって抑制される一方、XylR 依存的輸送体は抑制



第5図 キシロースまたはキシロースとグルコースの両方を糖源とする培地における輸送体多重欠損株におけるhrp遺伝子の発現



第6図 キシロース (Xyl) またはキシロースとグルコース (Xyl+Glu)、キシロースとフルクトース (Xyl+Fru)、キシロースとガラクトース (Xyl+Gal) を糖源とする培地における輸送体多重欠損株のhrp遺伝子の発現



第7図 キシロース (Xyl)、グルコース (Glu)、キシロースとグルコース (Xyl+Glu) を糖源とする培地における輸送体遺伝子の発現

(群)の発現を調べた。その結果、いずれの遺伝子(群)においてもキシロースのみを糖源とする培地では高い遺伝子発現が見られた一方で、キシロースとグルコースの共存する培地では、その発現は有意に低下した。また、グルコースのみを糖源とする培地では、それらの遺伝子発現は見られなかった。(第7図)。これらの結果は、上述のグルコースが XylIR 依存的キシロース輸送体の機能を抑制することを支持している。

白葉枯病菌が病原力を発揮するためには、さらにエフェクターによる宿主防御応答の抑制が必須である。そのためには、本細菌が感染期間を通して継続的かつ十分にキシロースを取り込み、HrpX を蓄積増加させることで hrp 遺伝子群を発現させ、エフェクターの分泌経路である T3SS を構築することが重要となる。イネ道管内は糖を含め栄養分が極めて希薄な状態である一方、細胞壁(道管壁)はキシロースの重合体であるキシランを多く含むことが知られている。白葉枯病菌は宿主への侵入直後に、XylIR 非依存的輸送体からキシロースを取り込み、XylIR を不活化することで XylIR 依存的輸送体を構築し、これにより XylIR 依存的/非依的な両輸送体から積極的にキシロースを取り込み、これを栄養源として初期増殖するとともに、hrp 遺伝子群の発現を活性化し、宿主防御応答を抑制すると考えられる。その後一定量まで増殖した細菌からは、セルラーゼ等の植物細胞壁分解酵素が分泌されるが、その酵素作用により、細胞壁(道管壁)の主成分のひとつであるセルロースからグルコースが生じる。また、構築された T3SS から分泌される TAL エフェクターによって、植物細胞の SWEET 遺伝子が活性化されることに

より、宿主細胞からスクロースが排出させられる。こうして排出されたスクロースを由来としたグルコースも存在する条件となる。白葉枯病菌にとってグルコースはキシロース以上に細菌増殖に適した糖であるため、より活発な細菌増殖が可能になる一方、XylIR 非依存的輸送体によるキシロースの細菌細胞内への取り込みは抑制されると予想される。しかし、グルコースによる機能阻害を受けない XylIR 依存的なキシロース輸送体が機能し続けることで、hrp 遺伝子群の発現には、継続的かつ十分なキシロースの取り込みが行われるのではないかと考えられた。

以上のように、本研究では細菌細胞内へのキシロースの取り込みが、イネ白葉枯病菌の hrp 調節因子 HrpX の蓄積増加、およびそれに伴う hrp 遺伝子群の発現に重要であることが示唆されたが、細菌細胞内のキシロースがどのような機構で HrpX の蓄積を制御するのかについては未だ明らかでなく、今後の重要な研究課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seiji Tsuge, Yumi Ikawa	4. 巻 125
2. 論文標題 Close relationships between hrp gene expression and sugars/sugar metabolism in <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pmpp.2023.102003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Seiji Tsuge, Yumi Ikawa, and Honoka Nakamura
2. 発表標題 Close relationships between hrp gene expression and sugar metabolisms in <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村保乃華・若狭洸哉・伊川有美・津下誠治
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌における推定cyclic di-GMP濃度調節因子X00_3074はhrp遺伝子の発現抑制に関与する
3. 学会等名 令和4年度 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮本祐奈・中村保乃華・伊川有美・津下誠治
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌のグローバル転写制御因子C1pは病原性に関与するセロピオンダーゼ遺伝子cbsAの発現を正/負に制御する
3. 学会等名 令和5年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村保乃華・高岡麻紀・伊川有美・津下誠治
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌のグローバル転写制御因子C1pによるNtrC様タンパク質NtrC3を介した負のhrpG発現制御
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊川有美・津下誠治
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌における転写制御因子XyIRによるhrp遺伝子群とキシロース輸送体遺伝子の同時制御の意義
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関