

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580051

研究課題名 (和文) イネ白葉枯病菌の病原性遺伝子 *hrp* の発現誘導に関わる植物シグナル受容機構の解明研究課題名 (英文) Signal receptors involved in virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

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

研究成果の概要：イネの重要病害である白葉枯病菌の病原性関連遺伝子の発現誘導システムを明らかにする目的で、環境シグナル受容機構の一つである二成分制御系、そして微量元素の効率的吸収システムである TonB-dependent receptor に着目した。本細菌のゲノム情報から、これらのシステムに関与する遺伝子を網羅的に抽出した。それらの遺伝子についての変異株の作出およびそれらの病原性検定の結果、少なくとも2つの二成分制御系関連遺伝子（すでに病原性への関与が報告されているものを除く）と、4つの TonB-dependent receptor 遺伝子の病原性に関与が示された。また、これらの遺伝子のうち、一方の二成分制御系は細菌の病原性因子の一つとして知られる鞭毛の形成を負に制御することを、そして他方の二成分制御系では、酸化ストレス耐性に関わる遺伝子の他、数種の既知病原性関連遺伝子の発現に関わることを明らかにすることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：イネ白葉枯病菌・二成分制御系・tonB-dependent receptor

1. 研究開始当初の背景

白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* はイネの重要細菌病の一つである白葉枯病の原因細菌であり、東南アジアをはじめとする世界の稲作地帯の多くで甚大な被害をもたらす。本細菌の病原性関連遺伝子についてはいくつかの報告があり、その中でもとくにグラム陰性細菌の多くに共通して保存される *hrp* 遺伝子群が、その病原性に重要な役割

を果たしていることが知られている。本遺伝子群は type III と呼ばれる細菌細胞と植物細胞を直接結ぶタンパク質分泌装置の構築に関わる遺伝子群である。本分泌装置を介して植物細胞内に注入されたタンパク質は植物の遺伝子発現をかく乱・抑制することで、植物が本来もつ微生物に対する抵抗性を抑え、その結果、白葉枯病菌をはじめとする病原体の植物体への感染、およびそこでの増殖

を可能にすると考えられている。

一般に *hrp* 遺伝子群の発現は、感染特異的に誘導される。また、他の病原性関連遺伝子の発現も多くの場合、厳密な制御が存在することが明らかになってきている。しかしながら、これらの遺伝子群の発現を発動させる因子に関する知見は皆無とって良い状態である。また、発動因子から病原性関連遺伝子の発現に至るシグナル伝達カスケードに関する情報も極めて乏しい。

2. 研究の目的

本課題では、白葉枯病菌の感染特異的な病原性関連遺伝子の発現誘導機構、とくにこれらの誘導システムの頂点にあると予想される、環境（植物）シグナル受容機構を明らかにすることを目的として企画された。

病原性関連遺伝子群の中でも *hrp* 遺伝子群については、既知 *hrp* 制御タンパク質である HrpG がその構造から、二成分制御系の一因子である response regulator と考えられている。本系は、環境シグナルを受容する sensor histidine kinase とそれからシグナルを受容し、それに対応した遺伝子発現を可能にする response regulator から成り、環境シグナルに対する応答システムとして広く細菌に保存されている。そこで本研究では、二成分制御系の sensor histidine kinase に着目し、これによる *hrp* 遺伝子群の発現誘導についての解明を中心課題の一つとした。また同時に、対象とする sensor histidine kinase は *hrp* 遺伝子群以外の病原性関連遺伝子の発現に関わる可能性もあり、それについても検討することとし、白葉枯病菌のもつ二成分制御系の病原性への関与を網羅的に調べた。

一方、これまで鉄イオンの選択的かつ効率的な吸収に関わるとされていた TonB-dependent receptor が糖をはじめとする鉄以外の微量要素の効率的な吸収にも関与することが報告された。白葉枯病菌は、イネの導管内でのみ特異的に増殖するが、導管内は糖をはじめとする栄養源が極めて希薄であることが知られている。したがって、本細菌がイネ葉導管内で増殖するためには、栄養を選択的かつ効率的に吸収する何らかのシステムが必要であると予想される。また、筆者は、自ら開発した白葉枯病菌の *in vitro* *hrp* 発現誘導システムを利用することにより、本細菌の *hrp* 遺伝子の誘導は、添加糖による影響を大きく受けることをすでに報告している。つまり、イネ葉導管内に存在する微量糖の効率的な吸収システムが細菌の増殖のみならず、病原性関連遺伝子群の発現制御にも関わることが予想される。そこで本研究のもう一つの柱として、白葉枯病菌のもつ TonB-dependent receptor の病原性、および

hrp 遺伝子群の発現誘導への関与についての解明も併せて行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 白葉枯病菌の二成分制御系 sensor histidine kinase および tonB-dependent receptor 遺伝子の抽出

白葉枯病菌 MAFF311018 は既に全ゲノム配列情報が明らかとなっている。この情報と各種 domain 検索サーバーを利用することにより、本細菌のもつ二成分制御系 sensor histidine kinase および tonB-dependent receptor 遺伝子を網羅的に抽出した。

(2) 白葉枯病菌変異株の作出

上記により得られた遺伝子についての破壊株の作出を以下の通り行った。まず、ターゲットとする遺伝子を含むゲノム断片をクローニングし、それを対象として、ランダム遺伝子挿入システムである EZ::TN<Kan2>を用いることにより、カナマイシン耐性遺伝子を挿入した。得られたカナマイシン耐性クローンの中から、制限酵素分析により目的の遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊されたクローンを選抜した。このようにして得られたプラスミドを白葉枯病菌 MAFF311018 に導入するマーカーエクステンジ法により、目的遺伝子の破壊された白葉枯病菌変異株を作出した。

(3) 白葉枯病菌変異株の病原性検定

一晩前培養した白葉枯病菌を $A_{600}=0.03$ になるように滅菌水で懸濁し、これを接種源とし、感受性イネ品種である IR24 に剪葉接種した。接種2週間後に病斑長を測定することにより、各変異株の病原性検定を行った。

(4) *hrp* 遺伝子群の発現解析

白葉枯病菌各変異株の *hrp* 遺伝子群の発現を解析するために、本細菌の *hrp* 遺伝子の一つである *hrpU* のプロモーター領域下流に *gus* 遺伝子を結合した融合遺伝子をもつプラスミドを各変異株に導入した。得られた形質転換体を本細菌の *hrp* 誘導培地で15時間培養後 GUS 活性を測定することにより、各変異株における *hrp* 発現能を調べた。

(5) マイクロアレイ解析

白葉枯病菌を適当な培地で培養後、全 RNA を抽出した。得られた RNA を鋳型として用いたマイクロアレイ解析は、常法に従った。

(6) RT-PCR

白葉枯病菌を適当な培地で培養後、全 RNA を抽出した。得られた RNA からの cDNA、PCR は ReverTra Ace および Blend Taq polymerase を用いて行った。

(7) 白葉枯病菌変異株の酸化ストレス耐性の検定

一晩前培養した白葉枯病菌を貧栄養培地 XOM2 に移植し、さらに一晩培養した。培養後滅菌水で 3 回遠心洗浄した後、細菌懸濁液を $A_{600}=0.3$ に調整した。1 ml の細菌懸濁液を遠心することにより得たペレットを 10 μ l の 10 mM H₂O₂ 溶液で懸濁し、10 分間室温に置いた。処理後 1ml の DW を加えて希釈し、そのうち 10 μ l を適当な培地上に滴下し、28°C で培養した。

4. 研究成果

(1) 白葉枯病菌の二成分制御系関連遺伝子の探索

細菌のもつ二成分制御系は環境変化にตอบสนองするための重要な経路である。本系は一般に外界シグナルを受容する sensor histidine kinase (SH) と、SH からのシグナルを受け、下流の遺伝子発現を調節する response regulator (RR) の組合せで構成されている。イネ白葉枯病菌のゲノムデータベースを解析したところ、本細菌は 26 個の SH と 49 個の RR、そして 14 個の SH-RR hybrid 型 (HY) の遺伝子をもつことが予想された。このように本細菌では、合計 89 の二成分制御系関連遺伝子をもつことが予想された。すでにゲノム解析が終了している他の *Xanthomonas* 属細菌についても併せて検討した。その結果、同じくイネを宿主とする *X. oryzae* pv. *oryzicola* では 98、カンキツの病原体である *X. axonopodis* pv. *citri* では 117、アブラナ科植物の病原体である *X. campestris* pv. *campestris* では 108、ナス科植物の病原体である *X. campestris* pv. *vesicatoria* では 123 の二成分制御系関連遺伝子と予想される ORF をもつことがわかった。このように *Xanthomonas* 属細菌は、非常に多くの二成分制御系遺伝子を持ち、これらにより種々の環境へ対応していることが考えられた。

(2) 白葉枯病菌 SH および HY 遺伝子破壊変異株の作出と病原力検定

白葉枯病菌の二成分制御系関連遺伝子である SH 及び HY 遺伝子については、これまで、X000386 (*phoP*)、X001101、X002421、X002724

(*rpfc*) が病原力へ関与すると報告されている。そこで本研究では、これらを除く 36 の遺伝子について、カナマイシン耐性遺伝子の挿入による破壊変異株を作出した。得られた破壊株を感受性イネ品種である IR24 に接種し、その 2 週間後に病斑形成を調べたところ、少なくとも sensor histidine kinase-response regulator のハイブリッド型タンパク質をコードする X000635 と sensor histidine kinase をコードする X002423 の 2 つの遺伝子についての変異株で病原力が低下することが明らかとなった(図 1)。そのうちとくに X002423 変異株での病原力の低下が顕著であった。

また、これらの変異株について相補試験を行ったところ、X000635 変異株では病原力の回復が見られなかったが、2423 変異株では完全ではないものの、病原力の復帰が確認された。

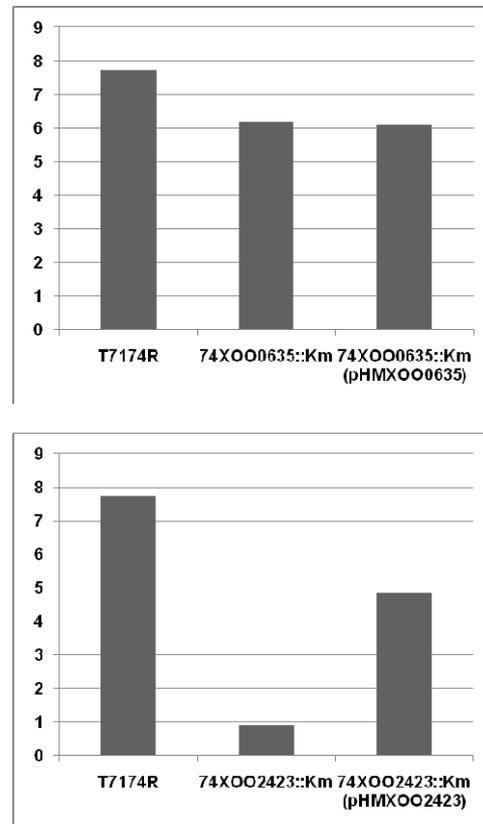


図 1 X000635 (上) および X002423 変異株 (下) の病原力の低下

X000635 変異株 (74X000635::Km) および X002423 変異株 (74X002423::Km) をイネ品種 IR24 に接種し、2 週間後の病斑長を測定した。縦軸は病斑長 (cm)。また (pHMX000635) および (pHMX002423) は相補プラスミドで形質転換されていることを示す。

(3) X000635 および X002423 の機能解析

X000635 および X002423 の *hrp* 遺伝子群の発現への関与を調べるために *hrcU* プロモーターと *gus* との融合遺伝子をもつプラスミドを含むプラスミドでそれぞれの変異株を形質転換した。得られた形質転換体を *hrp* 誘導培地で培養後、その GUS 活性を測定したところ、野生株由来の形質転換体と顕著な差は見られず、これらのタンパク質は *hrp* 遺伝子群の制御には関与しないことが明らかとなった。

次に、両タンパク質の制御を受ける遺伝子を明らかにするために、マイクロアレイ解析を行った。その結果、X000635 変異株では、カタラーゼ遺伝子をはじめとする数種の酸化ストレス耐性遺伝子の発現量が低下していることが明らかとなった。これらの遺伝子の発現量の低下が、実際に酸化ストレス耐性の低下を招いていることを確認するために、 H_2O_2 処理を行った。10mM H_2O_2 を 10 分間処理したところ、野生株と比較して変異株の生存率は著しく低下した (図 2)。また、復帰プラスミド導入株では、生存率の回復が見られ、本遺伝子が白葉枯病菌の酸化ストレス耐性に関わることが強く示唆された。

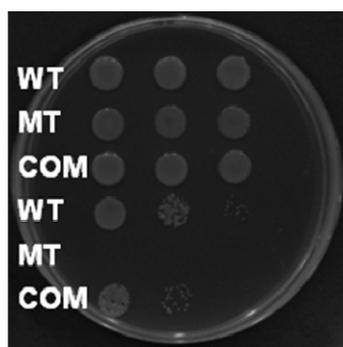


図 2 X000635 は白葉枯病菌の H_2O_2 耐性に関与する。

野生株 (WT)、X000635 変異株およびその相補株 (COM) を 10mM H_2O_2 で 10 分間処理した後、培地上に滴下し、28°C で 4 日間培養した。上 3 列が無処理区、下 3 列が処理区。

マイクロアレイ解析の結果、X000635 は病原性因子への関与が報告されている、PhoP/PhoQ と呼ばれる二成分制御系、およびそのシグナル伝達経路の下流に存在する DnaK、GroEL の発現を抑制していることが示された。また、この抑制の発現制御は RT-PCR によって確認された。上に示した病原性因子検定の際に、X000635 の相補株では病原性因子の回復が見られなかったが、これは相補プラスミドの導入による、病原性因子 PhoP/PhoQ システムの発現抑制によるものと考えられる。

一方、X002423 変異株を用いたマイクロアレイ解析の結果、本遺伝子の産物は、白葉枯病菌のべん毛遺伝子群の発現に関して、負の制御をしていることが明らかとなった。本遺伝子は、そのゲノム上でべん毛形成に関連する遺伝子群の近傍に座乗している。これまでのところ、本遺伝子の欠損に伴うべん毛の過剰生産と病原性との関連については明らかではない。

(4) 白葉枯病菌の TonB-dependent receptor 遺伝子の探索

近年アブラナ科植物を宿主とする *X. campestris* pv. *campestris* において、TonB-dependent receptor が、シユークロス吸収に関与すること、および本細菌の病原性への関与することが報告された。また、本細菌の TonB-dependent receptor の中には *hrp* 遺伝子の発現に関与するものもあることが明らかとなっている。そこで、本研究では白葉枯病菌の TonB-dependent receptor 遺伝子の病原性および *hrp* 遺伝子の発現誘導への関与について検討した。白葉枯病菌のゲノムデータベースから TonB-dependent receptor をコードすると予想される ORF を探索したところ、少なくとも 38 の ORF を抽出することができた。

(4) 白葉枯病菌の TonB-dependent receptor 遺伝子の病原性への関与

TonB-dependent receptor をコードすると予想される ORF について、欠損変異株を作成することに成功した。これらの病原性への関与を調べたところ、少なくとも 4 つの変異株でイネへの病原性の低下が確認され、これらの遺伝子産物がイネ葉内での細菌増殖に必要な微量元素の吸収に関与することが明らかとなった。しかし、本研究で得られた白葉枯病菌の病原性に関連する TonB-dependent receptor の中には、*hrp* 遺伝子の発現に関与するものはなかった。

以上のように、本研究において、イネ白葉枯病菌の病原性に関与する二成分制御系関連遺伝子、および TonB-dependent receptor 遺伝子としてそれぞれ 2 つ、および 4 つの遺伝子を新たに同定することができた。これらの遺伝子産物はいずれも細菌細胞膜に局在し、一方は、外界シグナルの受容装置として、また、一方は微量元素の吸収システムとして機能する、つまり、細菌と植物の相互作用の最前線で、またスタート地点で機能するタンパク質である。これらの機能として、当初期待していた *hrp* 遺伝子群の発現制御は含まれ

ていなかった。しかしながら、これらのタンパク質はいずれも白葉枯病菌が植物体内で生育・増殖するうえで、そして植物からのストレスにตอบสนองし、それに対応するうえで非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。これらが構成する二成分制御系が実際にどのようなシグナルを受容するのか、あるいはこれらの TonB-dependent receptor がどのような要素・成分の吸収に関与しているのかを明らかにすることが今後の課題である。

白葉枯病菌がイネを発病に導くまでには、type III 分泌装置を介したタンパク質導入によるイネの抵抗反応の抑制、そしてそれに引き続いておこる、導管内での爆発的な増殖と分解酵素や菌体外多糖質をはじめとする発病因子の生産による病斑形成、といったステップが考えられる。また、増殖の際には、障害ストレスに伴うイネの酸化物質の生成も予想される。今回同定された遺伝子は、とくに導管内での細菌増殖において重要な役割を果たしていることが考えられる。今後これらの遺伝子産物の機能をさらに解明することにより、イネ白葉枯病菌のイネ葉内での増殖機構、そして発病機構を明らかできると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

津下誠治・古谷綾子・落合弘和

病原性に関与するイネ白葉枯病菌の2つの二

成分制御系遺伝子の同定

平成 21 年度 日本植物病理学会大会

2009 年 3 月 26 日

山形市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし