

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380029

研究課題名（和文） 植物細菌の種の確立に伴う病原性遺伝子の彷徨と多様性に関する適応進化学的機能解析

研究課題名（英文） Evolutional and functional studies on diversification of virulence genes of plant bacteria with establishment of host species

研究代表者

曳地 康史（HIKICHI YASUFUMI）

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：70291507

研究成果の概要（和文）：*Pseudomonas cichorii* が感染したレタス葉は腐敗症状を、ナスは褐変症状を呈する。ナスに対する *Pseudomonas cichorii* の病原性にはタイプⅢ分泌系をコードする *hrp* とともに、隣接する *aldH* と *pat* が独立して関与した。系統進化解析から、*P. cichorii* は、*P. viridiflava* の S-PAI と共通の祖先から、*pat* と *hrp* を水平伝搬により獲得し、*aldh* とともに病原性の分化に対応したと考えられた。さらに、31 種の *Asteraceae* 植物に、*hrp*、*aldH* および *pat* が個々に関与するようになったのは、*Asteraceae* 植物の種の分化以降であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：*Pseudomonas cichorii* induces bacterial rot and necrotic spot in lettuce and eggplant. *P. cichorii* required the *hrp* genes (*hrp*) for its full virulence on eggplant. An aldehyde dehydrogenase gene (*aldH*) and a phosphinothricin N-acetyltransferase gene (*pat*) are located in the flanking region of *hrp* and were involved in the bacterial virulence on eggplant, independently of *hrp*. The phylogenetic analysis showed that *P. cichorii* strains acquires *hrp* and *pat* through horizontal transfer from a common ancestor with the S-PAI of *P. viridiflava* and implicate *hrp* and *pat* with *aldH* in its virulence. Inoculation into *Asteraceae* species showed that involvement of *hrp*, *aldH* and *pat* in *P. cichorii* virulence had no relationship with the phylogeny of the *Asteraceae* species. Therefore, *P. cichorii* might implicate not only *hrp* but also *aldH* and *pat* in its virulence on respective plant species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病理学、進化、農林水産物、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

植物細菌は植物からの幾層にもわたる抵抗反応をくぐりぬけて、宿主植物に寄生性と病原性を獲得する。植物細菌と植物との arms-race の結果もたらされる Balancing selection について Zigzag モデルが提唱されている。まず、植物細菌のフラジェリン等の分子パターンが、植物のパターン認識受容体により認識され、分子パターン誘導免疫が植物に誘導される (Phase I)。分子パターン誘導免疫に打ち勝つために、植物細菌はエフェクターを分泌し、エフェクター誘導感受性を誘導する (Phase II)。植物の抵抗性遺伝子タンパク質は、特定のエフェクターを認識し、エフェクター誘導免疫を誘導する (Phase III)。そして、植物細菌は、その特定のエフェクターを失うかあるいは新たなエフェクターを獲得し、エフェクター誘導免疫の打破を行う (Phase IV)。このように、植物細菌の病原性の獲得に、水平伝搬による彷徨と変異による病原性に関わるエフェクターの多様性が果たす役割は大きい。

動植物細菌のゲノム中には、病原性に関わる領域として PAI が存在する。DNA の GC 含量と塩基配列および遺伝子構成から、PAI は水平伝搬により獲得されたと推測されている。植物細菌において、*hrp* 遺伝子群、*hrp* 遺伝子群によってコードされたタイプ III 分泌系 (T3SS) から分泌されるいくつかのエフェクター (T3 エフェクター) 遺伝子および植物毒素産生遺伝子の水平伝搬について塩基配列の結果を基に論じられているにすぎず、病原性に関する機能的な側面からの論議はなされていない。また、これらの論議は Phase III と Phase IV について集中しており、種の確立に伴う植物細菌の病原性遺伝子の獲得と変異が病原性の分化および宿主適応に及ぼす機能的役割について論じた研究は数少ない。

Pseudomonas cichorii はレタスに腐敗病を、

ナスに褐斑細菌病を引き起こす植物細菌であり、それぞれの病徴出現には、*P. cichorii* 感染した植物細胞のプログラム自己細胞死 (PCD) が関与することが明らかとなっている。さらに、生化学解析から、レタスとナスそれぞれにおける PCD 誘導に関わるシグナル伝達系は同一ではないことが示されている。

2. 研究の目的

P. cichorii をモデルとして用い、種の確立に伴って生じる植物細菌の病原性の分化について、Pathogenicity island (PAI) の彷徨と多様性を機能的に解明するために、① PAI の病原性に関する適応進化的解析 ② 宿主応答の網羅的解析を目的とする。

3. 研究の方法

① PAI の病原性に関する適応進化的解析

トランスポゾン mini-Tn5lacZ2 と EZ: : TN <KAN-2> を用いて、*P. cichorii* SPC9018 株 (SPC9018) の変異株を作製し、レタスとナスに対する病原性解析を行った。SPC9018 と S-PAI を有する *P. viridiflava* Pv9504 株 (Pv9504) それぞれのゲノムライブラリーから、*hrp* 遺伝子群 (*hrp*) を含むゲノムアイランドを単離した。また、マーカーエクステンジ法にてゲノムアイランドに含まれる各遺伝子欠損株を SPC9018 から作製した。生化学実験から、それら遺伝子の機能解析を行った。さらに、ゲノムライブラリーに含まれる遺伝子と *gyrB* 遺伝子それぞれの塩基配列を基に、*Pseudomonas* 属細菌の分子系統解析を ClustalW にて行い、系統樹を TreeView にて作成した。

② 宿主応答の網羅的解析

SPC9018 と過敏間反応を誘導する *P. syringae* pv. *syringae* それぞれを接種 6 時間のレタス葉から単離した mRNA を基に均一化 cDNA ライブラリーを作製した。これら均一化

cDNAライブラリーを用いたディファレンシャル解析を行い、SPC9018接種により発現が変化するレタスcDNAライブラリーPcRGsを作製した。PcRGsに含まれる各遺伝子の発現の経時的解析を行うとともに、生化学解析により機能解析を行い、病徴発現のメカニズムを解明した。

4. 研究成果

①PAIの病原性に関する適応進化的解析

SPC9018 トランスポゾン変異株の中から、ナスに対する病原性を失い、レタスに対する病原性を保持した変異株を2株選抜した。これら2トランスポゾン変異株を接種したレタス葉では病徴の発達が遅延した。それぞれの株のゲノムDNAに、トランスポゾンは、*P. viridiflava* S-PAIの *hrcT* と *hrpG* に挿入されていた。SPC9018 ゲノムライブラリーから、*hrcT* と *hrpG* を含む約50-kbのDNA領域をクローニングし、塩基配列を解析したところ、*P. viridiflava* S-PAIの *hrp* と遺伝子構成と塩基配列が極めて高い相同性を示す *hrp* が SPC9018 ゲノムに存在した。*hrpG* 変異株を、SPC9018 の *hrpG* を含む *hrcC* オペロンとともに、Pv9504 由来の *hrcC* オペロンで形質転換したところ、ナスに対する病原性が回復した。さらに、分子系統解析の結果、*P. cichorii* の *hrp* は *P. viridiflava* の S-PAI の *hrp* と共通の祖先を有していると推察された。

hrp 変異株のナス葉での増殖は低下しており、感染細菌数のまま接種3日後まで推移した。一方、レタス葉ではSPC9018と比較して、増殖が遅延した。T3エフェクターに対応した植物応答により、ナスでの *P. cichorii* での増殖とPCD誘導が阻害されたと考えられた。一方、レタスの応答により、侵入直後の *P. cichorii* の増殖が遅延し、その結果、PCD誘導に伴う病徴出現が遅延したと考えられた。すなわち、*P. cichorii* はレタスとナスに対して病原性の分化が行われており、その分化に

hrp が関わると思われた。

hrp には、T3SSのトランスローケーターをコードすると想定される *hrpW* とそれと同一のオペロンを構成しシャペロン (*hrpW* オペロン) をコードすると想定され、*hrpW* の下流に位置する B3 遺伝子が存在した。*hrpW* 変異株と B3 遺伝子欠損株およびそれぞれの *hrpW* オペロンによる形質転換株を作製した。その結果、*hrpW* と B3 遺伝子はその他の *hrp* 変異株と同様に、ナスに対する病原性のみを失っていた。興味深いことに、*hrpW* 変異により *P. cichorii* 細菌数は著しく減少し、B3 遺伝子欠損株の細菌数の推移は他の *hrp* 変異株と同様であった。さらに、two-hybrid 解析から、HrpW タンパク質と B3 タンパク質は結合することが示された。すなわち、B3 タンパク質は HrpW のシャペロンとして機能しており、その助けにより、HrpW タンパク質はトランスローケーターとして T3 エフェクターの植物への分泌の制御に関わると推察された。

P. cichorii の *hrp* の上流には、aldehyde dehydrogenase 遺伝子 (*aldh*) と phosphinothricin N-acetyltransferase 遺伝子 (*pat*) が存在している。ゲノム上で、*aldH* と *pat* が隣接して存在するのは、*P. cichorii* とともに *P. viridiflava* の S-PAI に認められ、ゲノム解析が終了している他の *Pseudomonas* 属細菌では認められず、*pat* が *hrp* と *aldh* と隣接して存在するのは、*P. cichorii* と *P. viridiflava* BS グループの S-PAI に特徴的に認められた。さらに、*P. cichorii* と S-PAI の *pat* の塩基配列の相同性は、他の *Pseudomonas* 属細菌の phosphinothricin N-acetyltransferase 遺伝子と比較して、きわめて高かった。*aldh* と *hrp* の *Pseudomonas* 属細菌間の分子系統解析の結果、*aldh* は種ごとに同一クラスターを形成したが、*P. cichorii* の *hrp* は S-PAI と同一のクラスターを形成し、*P. viridiflava* の T-PAI は *P. syringae* と同一のクラスターを形成した。異なる系統進化を示した。すなわち、*pat* は *hrp* と同様に、S-PAI と

共通の祖先に由来しており、*aldH* はゲノムのもとも存在し、種の分化に対応して進化したと考えられた。

SPC9018 の *aldh* 欠損株と *pat* 欠損株は、いずれもナスに対する病原性を喪失したが、レタスに対する病原性は SPC9018 と同等であった。興味深いことに、*pat* 欠損株のナスにおける細菌数は著しく減少したが、*aldh* 欠損株の細菌数の推移は SPC9018 細菌数と同様の推移を示した。これらの変異株の *swarming motility* と *swimming motility* は SPC9018 株より向上した。さらに、AldH タンパク質は succinate aldehyde を基質とした aldehyde dehydrogenase 活性を示したことから、クオラムセンシングに AldH タンパク質が関わり、その結果、*P. cichorii* のナスに対する PCD 誘導に関わったと考えられた。また、*aldh* 欠損株のナスに対する病原性は、SPC9018 とともに他の *Pseudomonas* 属細菌の *aldH* による形質転換で相補され、*pat* 欠損株の病原性は、SPC9018 と Pv9504 の *pat* による形質転換で相補された。*P. cichorii* 感染ナス葉を用いた RT-PCR 解析から、*aldH* と *pat* の発現は *hrp* 発現制御系から独立していることが明らかとなった。以上より、*aldh* と *pat* は *hrp* とともに、*P. cichorii* の pathogenicity island を構成しており、*P. viridiflava* の S-PAI と共通の祖先が、*aldh* と *pat* の隣接領域に *hrp* を獲得した。その後、*P. cichorii* の種の確立後に、*P. cichorii* は水平伝搬によりこれら隣接領域を獲得したと考えられた。

hrp、*aldH* および *pat* が *P. cichorii* の病原性の分化に関与したかを解析するために、SPC9018 の宿主植物である 31 種の *Asteraceae* 植物（レタスを含む）に、*hrcC* 変異株、*aldh* 欠損株および *pat* 欠損株を接種した。さらに、これら 31 種の *Asteraceae* 植物の分子系統解析を、*ndhF* と *rbcL* の塩基配列を基に行った。*hrcC* 変異株、*aldh* 欠損株および *pat* 欠損株が病原性を示さなかったのは、それぞれ 9 種、

16 種および 6 種であり、いずれの株も病原性を示さなかったのは 5 種であった。これら 33 種の *Asteraceae* 植物の分子系統解析を、*ndhF* と *rbcL* の塩基配列を基に行ったところ、これらの種には系統進化学的な関連性は認められなかった。すなわち、*P. cichorii* のこれら 31 種の *Asteraceae* 植物への病原性に、*hrp*、*aldH* および *pat* それぞれが関与するようになったのは、*Asteraceae* 植物の種の分化以降であると考えられた。

②宿主応答の網羅的解析

シグナル伝達、転写/翻訳、防御/ストレスに関与すると想定された 20 個の PcRGs を単離した。PcRG1-5-5 (spliceosomal protein)、PcRG 2-9-2 (proteinkinase)、PcRG 1-6-2 (ACCoxidase) および PcRG7-5 (alternativeoxidase) は、*P. cichorii* 接種レタス葉と *P. syringae* pv. *syringae* 接種レタス葉で強く誘導された。興味深いことに、PcRG1-2-6 (proteinphosphatase 2C) と PcRG4-D-5 (proteinkinase) は *P. cichorii* 接種レタス葉のみで誘導されたが、PcRG1-3-2 (ribonucleoprotein) の発現は *P. syringae* pv. *syringae* 接種レタス葉でのみ誘導された。サリチル酸やメチルジャスモン酸処理によって、PcRG1-3-2、PcRG1-5-5、PcRG1-6-2、PcRG2-9-2 および PcRG7-5 の発現は誘導されたが、PcRG1-2-6 と PcRG 4-D-5 の発現は誘導されなかった。生化学解析の結果、*P. cichorii* による病徴と *P. syringae* pv. *syringae* による HR に、エチレンと Alternative oxidase (AOX) が関連していたが、*de novo* タンパク質合成と protein kinase は *P. cichorii* による病徴にのみ関与した。以上の結果から、*P. cichorii* による病徴と *P. syringae* pv. *syringae* による HR 時のレタス葉における PCD 誘導には、共通のシグナル伝達系が関わるが、関与する遺伝子の発現の量と時間および部分的にシグナル伝達系が異なると考えられた。

P. cichorii 接種レタス葉における ATP の消耗と AOX 遺伝子の発現誘導から、*P. cichorii* 接種

レタス葉でのミトコンドリアの機能不全が示唆された。さらに、そのミトコンドリアにおける活性酸素種の産生とともに、チトクロームcの細胞質への放出が認められた。さらに、ミトコンドリアのswelling活性の低下も認められた。ミトコンドリアのrespiratory complex III の阻害剤はswelling 活性の喪失を防いだが、活性酸素種の産生はミトコンドリアの膜透過性遷移の阻害剤によって影響を受けなかった。ミトコンドリアのrespiratory complex III と膜透過性遷移の阻害剤が、*P. cichori*が、DNAのラダー化は阻害されなかった。すなわち、ミトコンドリアはDNAのラダー化に独立したPCD経路に関わることが明らかとなった。

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 16 件)

- ①Shigeru Kajihara, Hiroshi Hojo, Makoto Koyanagi, Mayuki Tanaka, Hiroyuki Mizumoto, Kouhei Ohnishi, Akinori Kiba, Yasufumi Hikichi, Implication of *hrpW* in virulence of *Pseudomonas cichorii*, Plant Pathology, in press (査読有)
- ②Akinori Kiba, A., Kyon Ye Lee, Kouhei Ohnishi, Pyoyun Park, Hitoshi Nakayashiki, Yukio Tosa, Shigeyuki Mayama, Yasufumi Hikichi, Induction of reactive oxygen generation and functional changes in mitochondria and their involvement in the development of bacterial rot in lettuce caused by *Pseudomonas cichorii*. Physiological and Molecular Plant Pathology 74, 2009, 45-54 (査読有)
- ③Akinori Kiba, Kyon Ye Lee, Kouhei Ohnishi, Yasufumi Hikichi, Comparative expression analysis of genes induced during development of bacterial rot and induction of hypersensitive cell death in lettuce. Journal of

Plant Physiology 165, 2008, 1757-1773 (査読有)

- ④Hiroshi Hojo, Makoto Koyanagi, Masayuki Tanaka, Shigeru Kajihara, Kouhei Ohnishi, Akinori Kiba, Yasufumi Hikichi, The *hrp* genes of *Pseudomonas cichorii* are essential for pathogenicity on eggplant but not on lettuce. Microbiology 154, 2008, 2920-2928 (査読有)

[学会発表] (計 66 件)

- ①Masayuki Tanaka, An aldehyde dehydrogenase gene and a phosphinorhizin N-acetyltransferase gene compose of a pathogenicity island with *hrp* genes, 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, 2010 年 9 月 20 日, Miyazaki
- ②疋田唯, *Pseudomonas viridiflava* のレタスに対する病原性への pectate lyase 遺伝子と *hrp* 遺伝子の関与, 日本細菌学会第 4 回細菌学若手コロッセウム, 2010 年 8 月 26 日, 修善寺
- ③Masayuki Tanaka, An aldehyde dehydrogenase gene and a phosphinorhizin N-acetyltransferase gene compose of a pathogenicity island with *hrp* genes and are implicated in virulence of *Pseudomonas cichorii*, independently of *hrp* genes, 8th International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens, 2010 年 9 月 1 日, Oxford UK.
- ④疋田唯, *Pseudomonas viridiflava* の病原性分化への *pel* と *hrp* の関与, 日本植物病理学会平成 22 年度大会, 2010 年 4 月 18 日, 京都
- ⑤Wali Ullah, Involvement of *hrcC* and *aldH* in pathogenicity of *Pseudomonas cichorii* on Asteraceae plants, 日本植物病理学会平成 22 年度大会, 2010 年 4 月 18 日, 京都

- ⑥ Masayuki Tanaka, The aldehyde dehydrogenase gene and phosphinothricin N-acetyltransferase gene located in pathogenicity island is required for virulence of *Pseudomonas cichorii* on eggplant but not on lettuce, The 2009 KSPP Fall Meeting and the 1st Japan-Korea Joint Symposium, 2009 年 10 月 28 日, Jeju, Korea
- ⑦ 田中将之, *Pseudomonas cichorii* の pathogenicity island に存在する aldehyde dehydrogenase 遺伝子と phosphinothricin N-acetyltransferase 遺伝子は、ナスに対する病原性に必須である, 日本細菌学会第 3 回細菌学・若手コロッセウム, 2009 年 10 月 26 日, 宮崎
- ⑧ Yasufumi Hikichi, Involvement of the *hrpW* in virulence of *Pseudomonas cichorii* for virulence on eggplant but not on lettuce, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009 年 7 月 19 日, Quebec, Canada
- ⑨ Masayuki Tanaka, The aldehyde dehydrogenase gene and phosphinothricin N-acetyltransferase gene located in pathogenicity island is involved in virulence of *Pseudomonas cichorii*, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009 年 7 月 19 日, Quebec, Canada
- ⑩ 垣内加奈子, *Pseudomonas viridiflava* によるレタス腐敗病の発病機構の解析, 日本植物病理学会平成 21 年度大会, 2009 年 3 月 26-28 日, 山形
- ⑪ 田中将之, *Pseudomonas cichorii* のナスへの病原性に関する phosphinothricin N-acetyltransferase 遺伝子の関与, 日本植物病理学会平成 21 年度大会, 2009 年 3 月 26-28 日, 山形
- ⑫ 田中将之, *Pseudomonas cichorii* の病原性分化に対する Pathogenicity island の関与, 日

本細菌学会第 82 回総会, 2009 年 3 月 12 日, 名古屋

- ⑬ 田中将之, *Pseudomonas cichorii* のナスへの病原性に関する aldehyde dehydrogenase 遺伝子の機能的および系統進化学的解析, 日本植物病理学会平成 20 年度大会, 2008 年 4 月 26 日, 松江
- ⑭ 小柳諒, *Pseudomonas cichorii* の *hrp* 遺伝子群の系統進化学的機能解析, 日本植物病理学会平成 20 年度大会, 2008 年 4 月 26 日, 松江

[図書] (計 7 件)

- ① 渡邊雄一郎, 曳地康史, 植物をねらう生物の戦略と植物の防御戦略, 遺伝 2010 年 9 月号, NTS (東京), 2010, 17-19
- ② 曳地康史, 圃場における発生細菌病. 植物病理学 (眞山滋志・難波成任編). 文永堂 (東京), 2009, p. 105-109

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~yhikichi/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曳地 康史 (HIKICHI YASUFUMI)
高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号: 70291507

(2) 研究分担者

木場 章範 (AKINORI KIBA)
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
研究者番号: 50343314

大西 浩平 (OHNISHI KOUHEI)
高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号: 50211800