

植物病原性及び過敏反応の両方を司る 遺伝子領域 (hrp) の発現機構

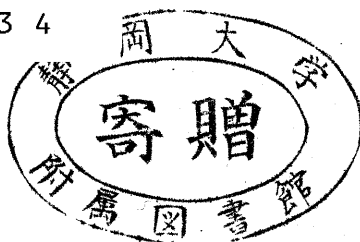
課題番号 04660045

平成5年度科学研究費補助金 (一般研究C)
研究成果報告書

静岡大学附属図書館 成6年3月



030850243 4



研究代表者 露 無 慎 二

(静岡大学農学部)

3
大学附属図書館

植物病原性及び過敏反応の両方を司る 遺伝子領域 (hrp) の発現機構

課題番号 04660045

平成5年度科学研究費補助金 (一般研究C)
研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 露 無 慎 二
(静岡大学農学部)

はしがき

トランスポゾンタッキングの利用により、接の表現型が不明であっても、植物の病原性発現に必要な遺伝子がとらえられるようになってきた。こうしてとらえられた代表的な遺伝子である hrp 遺伝子群は、宿主植物には病原性を、非宿主植物には過敏反応を誘導する。従って、hrp 遺伝子群は病原菌の植物との相互反応においてごく初期において中心的な役割を果たすものと考えられる。hrp 遺伝子群の機能を知ることが出来れば、植物病原性のメカニズム解明に向けて重要な知見が得られるばかりでなく、特異的（安全性の高い）防除法、正確な診断法、抵抗性育種法等について新しい発展が期待出来る。これまでの研究から、これらの遺伝子は、(1) 25 kb 程の領域にクラスターを形成している、(2) 同じグループに属する病原細菌の間で相同性を示す、(3) 植物体の細胞間隙内では増殖出来ずに死滅するなどの情報は得られているが、これらの遺伝子の直接の機能についてはほとんど解明されていない。

著者らは、カンキツかいよう病菌 (Xanthomonas campestris pv citri) より Tn5 を用いたトランスポゾンタッキングによって、hrp 変異株を含む 10 株の病原性欠損変異株を分離していた。本研究では、特に本細菌の hrp 遺伝子を中心にこれらの機能を調べた。その結果、カンキツかいよう病菌のコスミドライブラリーを構築し、hrp 遺伝子領域を含むコスミドクローンを得て、本遺伝子群を解析することにより、発病及び過敏反応誘導に携わる分子について新知見を得ることが出来た。さらに、hrp 遺伝子群をプローブとして用いた RFLP 解析を行い、病原性遺伝子の進化が他の遺伝子群の進化とは独立して行われることを示唆することが出来た。また、この方法を用いた簡易同定法確立することが出来、応用の分野においても研究を進展させることが出来た。

本報告は、後に紹介するように一部研究発表を行ったが、ここでは未発表のものも含めてとりまとめて報告する。

平成5年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

1. 課題番号 04660045

2. 研究課題 植物病原性及び過敏反応の両方を司る遺伝子領域 (hrp)
の発現機構

3. 研究組織

研究代表者： 露無慎二 （静岡大学農学部助教授）

4. 研究経費

平成4年度 1500千円

平成5年度 700千円

計 2200千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Gold, S., S. Nishio, S. Tsuyumu and N.T. Keen (1992)
Analysis of the peLE promoter in Erwinia chrysanthemi.
Mole. Plant-Microbe Interact. 5:170-178.
2. Kumagai, K., M. Kato, S. Nabeshima and S. Tsuyumu (1992)
T1801A,B,C, and D, new quinone and hydroquinone
antibiotics produced by a strain of Pseudomonas.
Biosci. Biotech. biochem. 56:1439-1442.
3. Tsuyumu, s., M. Watanabe, K. Abe, S. Watabe, S. Arai,
M. Goto and Y. Takikawa (1992) Simple and sensitive
method for the detection of Escherichia coli in natu-
ral environments using ice nucleation active gene.
Biosci. Biotech. Biochem. 56:1867-1868.

4. Tamura, K., Y. Takikawa, S. Tsuyumu, M. Goto and M. Watanabe (1992) Coronat production by Xanthomonas campestris pv. phorcolola. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58:276-281.
5. Tsuyumu, S., K. Tanaka, N. Furutani, Y. Takikawa and C. Boucher (1994) Genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. citri. Proc. Internat. Conf. Plant Pathogenic Bacteria 8: (in press)
6. Takikawa, Y., N. Nishiyama, K. Ohba, S. Tsuyumu and Goto, M. (1994) Synonymy of Pseudomonas syringae pv. maculicola and Pseudomonas syringae pv. tomato. Proc. Internat. Conf. Plant Pathogenic Bacteria 8: (in press)
7. Goto, M., M. Takagaki, A. Kodera, Y. Takikawa and S. Tsuyumu (1994) Effect of Benomyl on seedling rot of rice (Pseudomonas glumae) and microbial interactions on germinating. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60 (1):74-81.
8. Jhoncon, J., M. Miura and S. Tsuyumu (1994) Cloning of a region encodes multiple polygalacturonases of Erwinia carotovora subsp. carotovora ECl. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60(2): (in press)
9. Jhoncon, J., F. Sakai and S. Tsuyumu (1994) Determination of nucleotide sequence of a region producing multiple polygalacturonase from Erwinia carotovora subsp. carotovora. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60(2): (in press)

(2) 口頭発表

1. 中井朋則・西尾昌一・露無慎二・酒井富美・N.T. Keen (199

- 2) ペクチン酸リアーゼ (pelE) 遺伝子のオペレーターに結合するタンパク質。日本植物病理学会報 58:236
2. 田中敬子・古谷暢之・金井直美・露無慎二・瀧川雄一・後藤正夫(1992) カンキツかいよう病菌 Xanthomonas campestris pv. citri の2種の hrp 領域のクローニング。日本植物病理学会報 58:238
3. 中島雅己・後藤正夫・露無慎二・瀧川雄一 (1993) キウイフルーツかいよう病菌 Pseudomonas syringae pv. actinidiae 銅耐性遺伝子について。日本植物病理学会報 59:162
4. 金森裕之・田中敬子・露無慎二・瀧川雄一・後藤正夫 (1993) 大腸菌ボーリン遺伝子とカンキツかいよう病菌の病原性遺伝子との相同性。日本植物病理学会報 59:163
5. J. Jhoncon, S. Tsuyumu and F. Sakai (1993) Determination of the nucleotide sequence of the gene for polygalacturonase of Erwinia carotovora subsp. carotovora. 日本植物病理学会報 59:164
6. 中井朋則・露無慎二(1993) ペクチン酸リアーゼ遺伝子 (pelE) 制御部に結合する複数のタンパク質の解析。日本植物病理学会報 59:60

研究成果

目次

第1章	カンキツかいよう病菌の <u>hrp</u> クラスター	1
1)	病原性欠損変異株	1
2)	<u>hrp</u> 領域のクローニング	2
3)	<u>hrp</u> 領域の制限地図	3
4)	<u>hrp</u> 変異株の相補テスト	3
第2章	<u>hrp</u> クラスターを用いた RFLP 解析	4
1)	<i>Xanthomonas</i> 属細菌の RFLP	4
2)	RFLP 解析結果に基づく系統図	4
第3章	カンキツかいよう病菌のその他の病原性遺伝子	6
1)	グルカン	6
2)	ポーリン	6
3)	エリシター	7
第4章	<u>hrp</u> 遺伝子群の制御機構	8
1)	遺伝子融合体の作成	8
2)	大腸菌における <u>hrp</u> 遺伝子群の発現	9
3)	他の植物病原細菌における発現	9
第5章	その他の病原性因子の制御機構	9
1)	ペクチン酸リアーゼ	9
2)	ペクチンリアーゼ	10
3)	ポリガラクツロナーゼ	11
参考文献		12
図表		14

第1章カンキツかいよう病菌のhrpクラスタ

1) 病原性欠損変異株の分離

Boucherらは、ナス科植物青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum*) から、宿主植物には病原性を、非宿主植物には過敏反応を司り、植物病原菌と植物細胞との相互作用において根幹的な役割を担う hrp 遺伝子群 (約25 kbからなるクラスタ) の存在を報告した (1)。この青枯病菌の hrp クラスタは世界中で分離された青枯病菌のどの菌株とも相同性を示すばかりでなく、*Xanthomonas* 属細菌とも相同性を示すことが判明した。従って、hrp クラスタは同じグループの植物病原細菌間で共通して保存されている特徴的なクラスタであると考えられる。

先に、我々はカンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) の病原性遺伝子を解析することにより、発病機構を明らかにするため、ランダムトランスポジションによる病原性欠損変異株の分離実験を行った (2)。まず、いくつかのカンキツかいよう病菌分離株と自殺用プラスミドとの組み合わせの中から、接合効率がよく、自殺率が100%近くになるものを探し、かいよう病菌L9株と自殺ベクターpSUP1021との組み合わせが上記条件を満たすことがわかった。この組み合わせを用いて、栄養要求変異株を分離し、これらの要求栄養素を決定したところ、異なる栄養要求株が得られていることが確認され、Tn5挿入がほぼランダムに行われていると判断された。さらに、ランダムに選んだ接合体のDNAのEcoRI断片についてTn5を含む小プラスミドpRZ102をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を行い、単一のランダムな挿入が得られていることを確認した。なお、栄養要求性変異株は約3%の割合で得られており、有効な変異誘発が行われていると判断された。栄養要求株の中には病原性を失うものがあつたが、通例に従いこれらを病原性特異的欠損変異株とは扱わないこととした。次に、他の植物病原細菌の例から病原性に関与すると考えられたベクチナーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ等の酵素の分泌能を失った変異株を得たが、これらの病原性は注射器による葉肉内接種では野生型のそれと変わらなかった。したがって、これらの酵素の分泌は、葉肉内における発病に絶対的に必要なものではないと考えられた。

また、*Xanthomonas*属細菌に特有の黄色色素（カロテノイド）非生産変異株も得られたが、顕著な病原性の低下は見られなかった。しかし、この変異株は強い可視光線に対する抵抗性が弱まっており（図1）、黄色色素が太陽光線の照る自然環境下における生存を有利にしているものと考えられた。これらの予備実験の後、いよいよ未知の病原性遺伝子をとらえるべく、接合体一つづつをナツダイダイの葉にゴムプレス法で接種していった。こうして接種した1,600個の接合体から10株の病原性を喪失した変異株を得た。マスタープレートから、単集落分離した後、いずれもprototrophicであることを確認した。これらの病原性欠損変異株のうち4株は、YP液体培地での増殖速度が野生型のそれに比べ約40%程遅くなっていた（表1）。ここでは、一応この程度の増殖速度の低下は病原性の喪失の原因とは考えにくいと判断し、これら10菌株を病原性特異的欠損変異株として取り扱うこととした。

2) カンキツかいよう病菌の hrp 領域のクローニング

上記のごとく青枯病菌の hrp 領域は *Xanthomonas* 属細菌と相同性を示すことが報告されているので、青枯病菌の hrp 領域のほぼ全領域を含むクローン (pVir2) (3) をプローブとすることにより、上記 F1-F10 のカンキツかいよう病菌の病原性欠損変異株の中にこの領域に変異が導入されたものがあるかについて調べてみた。そこで、pVir2 の EcoRI 断片をサブクローニングし、二種の断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより、カンキツかいよう病菌のコスミドベクター pLAFR5 を用いたゲノミックライブラリーを調べ、これらの DNA 断片と相同性を示す領域を含むクローンを得た。pVir2 の大部分の hrp クラスター領域をプローブとした場合、pXCF13-38、pXCF13-44 の2クローン (グループ1) が、pVir2 の hrp クラスターの一部と dsp 領域を含む断片をプローブとした場合、pXCF6-30、pXCF9-39 の2クローン (グループ2) が得られた。また、Tn5 挿入による病原性欠損変異株の内、F8 は典型的な hrp マイナスの変異株であったので、F8 株における Tn5 挿入 EcoRI 断片をプローブとして、pXCF15-52、pXCF16-33、pXCF

5-173、pXCF 10-88の4クローン(グループ3)を得た。

3) 制限地図

グループ3のコスミドクローンについて、各種制限酵素を用いて遺伝地図を作成し、F8変異株におけるTn5挿入位置を決定した(図2)。この遺伝地図を元に下の相補テストを行った。

4) hrp変異株の相補テスト

a) 相補テスト用プラスミドの検討

コスミドベクターとして用いたpLAFR5は、広範な細菌中で複製可能であることが報告されているが、カンキツかいよう病菌の中では複製出来ないことが判った。そこで、選択圧の非存在下でも安定に保たれるプラスミドを検討した。その結果、pSF6とpSUP205がともに高い効率で大腸菌よりトライビアレンタル・メーティングによりカンキツかいよう病菌に移行されることが判った(表2)。さらに、これらの接合体について、選択圧のない状態で植えつぎをおこなったところ、pSUP205はキュアリングがみられなかったが、pSF6は容易にキュアリングされた。このことから、pSUP205がカンキツかいよう病菌における相補性テストに適していると判断した。

b) F8の相補性テスト

病原性欠損変異株F8における宿主植物における病原性及び非宿主植物における過敏反応誘導能を回復させる領域をサブクローニングを試みた。ベクターpSUP205にpXCFFII10-3のEcoR1断片をいったん大腸菌にサブクローニングした。次に、これをエレクトロポレーションによりF8株に導入した。得られた形質転換体pX8を組換え実験室内でナツダイダイの葉及びタバコの葉の細胞間隙に注入して反応を見た。ナツダイダイでは、F8では全く反応が見られなかったが、pX8の場合は接種後1週間頃から黄変が始まった。しかし、完全なかいよう症状を呈するには至らなかった。また、タバコでは、F8は接種後3日を経ても全く反応が見られなかったが、接合体では、接種後48時間後に黄変が見られた。しかし、典型的な過敏反応(褐変)には至らなかった。このように部分的な相補しか観察できなかった原因として、

プラスミド状態で導入した場合、hrp遺伝子間の発現バランスが乱れたためと考えられた。

第2章 hrpクラスターを用いたRFLP解析

1) Xanthomonas属細菌のRFLP.

一般に、hrpクラスターは同じグループの植物病原細菌間でDNA塩基配列において相同性が高いことが報告されている。それだけ、病原性の中心的役割を担うものであるということであろう。また、病原性遺伝子が他の遺伝子に遅れて進化したものであることを示唆していると考えた。とすると、hrpクラスターがXanthomonas属細菌の種、pathovar等の下級の分類群で、各々相同性を示すと考えられる。そうだとするならば、Xanthomonas属細菌一般の同定ばかりでなく、各speciesや各pathovarの同定にも、RFLPが威力を発揮出来るはずである。そこで、X.c. citriの様々な分離株について今回得られたhrp領域のコスミドクローン(pXCFl3-38, pXCFl3-44)をプローブとしてRFLP解析を行った。泳動距離が同じ位置にくるバンドの数を%で表示すると、類似度が高いことが確認された。一方、他のpathovarに属するXanthomonas属細菌のRFLPパターンはpv.citriのそれとは異なったが、同一種やpathovar内ではやはり類似度が高かった(表3)。従って、hrp領域という病原性遺伝子のクラスターを用いることにより、Xanthomonas属細菌の各種、pathovarを判定できることが判り、今後Xanthomonas属細菌の各種及び各pathovarの同定に有用であることが明かとなった。

興味あることに、同じXanthomonas属細菌であっても病原性を持たない“非病原性細菌”として分離されたものが、カンキツかいよう病菌のhrp領域と相同性を示すものがあったということである(表4)。この事実は植物に随伴する非病原性細菌の病原性の進化に情報を与えるものとして注目され、今後検討されるべき課題である。

2) RFLP解析結果に基づく系統図

上記 RFLP の結果から Xanthomonas 属細菌の各 pathovar を分類出来ることが判明した。そこで、従来より用いられてきた微生物学的性状に基づく分類結果と比較すれば、病原細菌の代謝等の基本生命活動に用いられる遺伝子と病原性遺伝子の進化を比較出来るのではないかと考えた。この比較を行うため RFLP に基づく分類結果を系統図で表し、微生物学的性状に基づいた分類結果による系統図を比較してみた (図 3)。その結果、両方法による分類結果で大きく異なる結果になるものが出てきた。このことは、植物病原性遺伝子は他の生命活動に本来必要な遺伝子群とは異なる進化の過程をたどるものであることを示唆するものである。

第3章 カンキツかいよう病菌のその他の病原性遺伝子

1) グルカン

Pseudomonas syringae pv. *syringae*では、hrpクラスターとは別個に存在するもう一つのhrp遺伝子 (hrpM) の存在を発表している (4)。Bohinらは (5)、このhrpM領域が大腸菌の膜局在性多糖質 (membrane derived oligosaccharide, m d o) の合成を司るm d o G, H遺伝子と相同性を示すばかりでなく、また、大腸菌のm d o遺伝子マイナス変異株が上記hrpMによって相補されることを報告している。そこで、これらのhrpM及びm d o A遺伝子との相同領域が上記カンキツかいよう病菌の T n 5 挿入病原性欠損変異株の挿入部位、上記コスミドクローンに存在するか否かについて調べた。まず、それぞれの遺伝子のクローンをプローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーション解析を行うと、F5及びF7変異株において T n 5 の挿入位置と同じ所でバンドが見られた。しかし、hrpM及びm d o Aの構造遺伝子を切り出した断片をプローブとすると、これらのバンドは検出されなくなった。このことから、F5及びF7株は T n 5 挿入に用いた自殺用複合プラスミドベクター pSUP1021 全体が挿入されていると考えられた。最近、共同研究者であるフランスのリーユ大学のBohin教授は、カンキツかいよう病菌野生型 L9 は環状 (β -1,2) グルカン合成を見いだした。しかし、大腸菌のグルカンは β -1,2及び β -1,6からなる鎖状グルカンであることが報告されており、グルカン合成の遺伝子の構造も m d o A 或いは hrpM との相同性は低いのではないかと思われる。環状グルカンは、Agrobacterium tumefaciens や Rhizobium 属細菌で植物細胞への吸着に不可欠なものであることが報告されている。カンキツかいよう病菌においても、この環状グルカンが植物細胞への吸着に関与することにより発病や過敏感反応に導いている可能性が示唆された。

2) ポーリン

上記カンキツかいよう病菌の病原性欠損変異株の中でF5とF7はテトラサイクリンとクロラムフェニコールに対して耐性を示した (表5、6)。大腸菌では、ポーリンタンパク質欠損変異株が同様な表現型を示すことが報告さ

れている。ポーリタンパク質はグラム陰性細菌の外膜に存在し、親水性低分子物質の外膜通過を司る。大腸菌においては、水島らによって(6、7)ポーリン生産遺伝子(ompC, ompG)がクローニングされ、これらの塩基配列が決定されている。そこで、これらのポーリン遺伝子をプローブとしてF5とF7についてサザンブロットハイブリダイゼーション法によって解析したところ、野生型にくらべF5とF7株ではバンドがシフトした。このことから、F5とF7株では、Tn5がポーリン遺伝子に挿入したことにより病原性を喪失したのではないかと考えられた。

3) エリシター

一般に、植物病原細菌を非宿主植物の細胞間隙に注入すると、24時間以内に過敏反応を誘導し24時間以内に褐変が見られる。ところが、Xanthomonas属細菌の場合には、同様な接種を行っても全く反応が見られなかったり、24時間以上経過して始めて弱い過敏反応が見られたりする。この原因として、カンキツかいよう病菌は、過敏反応誘導因子の他にこの作用を阻害する物質(サブレッサー)の双方を生産しているのではないかと考え以下の実験を行った。

(a) 過敏反応極初期における化学発光

病原菌が非親和性植物の細胞と接触すると、フリーラジカルが生成されるが、この時化学発光量が上昇することが報告されている(8)。そこで、カンキツかいよう病菌の非宿主であるタバコの培養細胞に病原細菌を加え、経時的に化学発光測定器(東北電子社製)を用いて化学発光量を測定した。図4に示したように、一時間以内に化学発光量の増加が見られ、その後、高いレベルで一定に保たれることが確認された。なお、糸状菌のエリシターとして報告されているキトサンをポジティブコントロールとして用いたが、この添加による化学発光の上昇と同じようなパターンをカンキツかいよう病菌接種の場合も示している。このことから、カンキツかいよう病菌においてもエリシター様物質が生産されているのではないかと考えられた(図4)。

(b) エリシター・サブレッサー分画

タバコ細胞とカンキツかいよう病菌の混合培養液を遠心し、その上澄み液を

透析膜を用いて高分子分画と低分子分画に分け、それぞれについて凍結乾燥により濃縮し、これをタバコ培養細胞に加えた結果が図5に示してある。高分子分画を加えることにより、キトサン、病原菌を加えた場合と同様な化学発光量の上昇が見られた。さらに、興味あることに、低分子分画をキトサンと同時にタバコ培養細胞に加えると、キトサン添加で見られた化学発光の上昇が見られなくなった(図5)。このことから、低分子分画にはサブレッサー様物質が存在すると考えられた。なお、カンキツかいよう病菌の単独培養の場合も高分子分画にエリシター活性がみられた。この場合、細菌数あたりに換算すると化学発光上昇力では、混合培養した場合の方が細菌単独培養の場合よりも高かった。従って、元来カンキツかいよう病菌が basal level でこのエリシターを生産しているが、非宿主植物との遭遇によって生産誘導されるものと考えられる。

(c) エリシターの生化学的性状

上記のごとく得たエリシター分画の熱安定性と各種高分子物質分解酵素処理による失活の有無を検討した。まず、5分間の煮沸処理をした場合、エリシター活性の低下は見られなかった。従って、このエリシターは熱安定性であるといえる。高分子物質分解酵素処理の場合は、DNase及びRNase処理ではエリシター活性は全く影響を受けなかったが、Protease処理を行うと、エリシター活性は完全に失活した(図6)。なお、Protease処理の場合、処理液をそのままタバコ培養細胞に加えると、レセプターが失活される可能性が考えられたので、処理後、熱処理をしてからタバコ培養細胞に加えて試験した。いずれの場合も、化学発光の上昇が見られたことから(図7)、本エリシターは耐熱性のペプチドであると考えられる。

第4章 hrp 遺伝子群の制御機構

1) 遺伝子融合体の作成

アルカリフォスファターゼ遺伝子をレポーター遺伝子とした遺伝子融合体作成用トランスポゾン(TnphoA)を用いて、グループ3の四つのコスミドクローン上にランダムに挿入させ、約100種の融合体を得た。これより13

種類の融合体を撰び、それらの制限地図上での挿入位置を決定した（図8）。

2) 大腸菌内における hrp 遺伝子群の発現

大腸菌内で作成した TnphoA と hrp 遺伝子群との融合体を YP 培地及び最少培地でアルカリフォスファターゼ比活性を測定した。Pseudomonas syringae グループの hrp 遺伝子群は、最小培地や植物汁液培地で発現が誘導されることが報告されているが（9）、いずれの条件においても顕著な誘導はみられなかった（表7）。これは、カンキツかいよう病菌のプロモーターが大腸菌内では機能しにくいためであろうと判断された。

3) 他の植物病原細菌における hrp 遺伝子群の発現

別種の植物病原細菌 Pseudomonas syringae pv. actinidae にこれら融合プラスミドをエレクトロポレーションにより導入し、同様な試験を行ったが、アルカリフォスファターゼの比活性の上昇はみられなかった（表8）。カンキツかいよう病菌内における発現については、本ベクターが同菌内で安定に他も垂れらにため、実験が行えなかった。今後、上記実験で有用性が明らかになった pSUP205 にサブクローニングして調査しなければならない。

第5章 その他の植物病原性遺伝子の制御機構

1) バクチン酸リアーゼ

バクチン酸リアーゼ（PL）は、軟腐性 Erwinia において主要な発病遺伝子であることが遺伝学的、生理学的実験から示されている（10）。しかし、多くの植物病原細菌ばかりでなく、非病原性細菌も本酵素を生産することが報告されている。また、軟腐性 Erwinia 属細菌において、4-5の PL アイソザイムが生産されることが報告されている。従って、本細菌において特定の PL アイソザイムが大量に生産・分泌されるメカニズムを解明する必要があると考え、以下の実験を行った。

a) pelE 遺伝子のプロモーター

P L eは *Erwinia chrysanthemi* では感染の場においても最も活発に生産される。pelEは P L eをコードする遺伝子であるが、本構造遺伝子の5'末端側上流領域の塩基配列は図9のようになっている。まず、転写開始点をプライマー-エクステンション法によって調べたところ、通常の培養条件下で3箇所(0、+18、+40)の転写開始点が存在することが判明した(図10)。さらに、転写開始点0の上流にあるプロモーターに部位指定変異作成法によって変異を導入すると、-63、+47、+61に新たな転写開始点が現れることが判った。しかし、誘導条件下、非誘導条件下、カタボライト抑制解除条件下で異なる増殖期の培養細菌からmRNA分離し、プライマー-エクステンションを行った結果、いずれも0、+18、+40の3箇所の転写開始点であることに変わりがなかった。従って、これらの培養条件によるプロモーターの使い分けはないと判断された。なお、0と-63の転写開始点の前には大腸菌のσ70型コンセンサス配列がみられたが、他の転写開始点の上流にはその他の既知プロモーターコンセンサス配列は見られなかった。何故、このように多数の転写開始点が存在するかについて、現在のところ答はないが、全く新しい制御機構の存在が立証され、今後詳細な解析を行っていきたい。

b) 制御タンパク質の検討

上記pelEの野生型及び変異型上流領域をPCRで増幅し、放射性同位元素で標識した後、ゲルリターデーション法により結合タンパク質について解析を行った。その結果、プロモーター、CAP(cAMP結合タンパク質)結合領域の他、すくなくとも3つの制御領域があり、既知負の制御タンパク質であるKd g Rの他2個の正の制御タンパク質が結合することが判った。尚、Op2にはKd g Rと生の制御タンパク質も結合することが判り、両制御タンパク質が同じ部位に結合を競うことにより制御が行われている可能性が示唆された。上記複数のプロモーターの解析とこれらの制御タンパク質の解析とをドッキングさせることにより、pelEの制御機構が明らかになるであろう。

2) ペクチンリアーゼ

本酵素の生産はDNA損傷物質の添加によって誘導される。最近、磷酸欠乏

や低温培養によってSOS反応が誘導されることが報告された(11)。このような条件は普通栽培条件下で充分考えられる条件であることから、このような条件下における本酵素構造遺伝子(pnlA)及び本酵素の制御遺伝子(digA)の誘導の有無についてβ-ガラクトシダーゼ遺伝子との融合体を用いて調べた。その結果、コントロールとして用いたSOS遺伝子の一つであるumuCでは、誘導が確認されたが、pnlAとdigAのいずれの遺伝子も転写誘導を受けなかった。したがって、既に当研究室から発表した植物体内のDNA損傷物質の存在が重要な意味を持つものと思われる。また、pnlAの制御タンパク質についてもゲルシフトアッセイ法を用いて検討を行ったところ、ここでもDigA以外の複数の制御タンパク質の存在が明らかにされ、単純なSOS反応の一つとしての制御ではなく、複雑な制御下にあることが示唆された。

3) ポリガラクトナーゼ

ポリガラクトナーゼ(Peh)は植物病原菌を始めとした微生物ばかりでなく、植物体を持つ酵素である。軟腐病性Erwinia属細菌においては、古くからペクチナーゼが発病因子として重要であることが言われてきている。しかし、Pehの重要性については報告がない。Pehは最適pHが酸性側にあり、酸性条件下にある植物体内では植物組織崩壊に威力を発揮することが充分考えられる。さらに、そ菜軟腐病菌Erwinia carotovora subsp. carotovora EC1株は複数のPehアイソザイムを生産分泌することが判った。そこで、これらのアイソザイムがどのような制御を受けているかをしらべるため、それぞれのアイソザイムを生産する領域のクローニングを試みた。その結果、1.8 kbのDNA断片が4つのアイソザイムを生産することが判った(12)。これまで報告されているPehの分子量は約4万程であり、どのようにそれぞれのアイソザイム生産遺伝子が配列されているのかに興味を持たれた。そこで、この断片のDNA塩基配列を決定した(図11)(13)。両方向についてオープンリーディングフレームを検討したが、このサイズのタンパク質をコードする領域は一つしか(ORF1)見あたらなかった。ORF1は既報の他の軟腐病菌のpeh遺伝子と高い相同性を示したばかりでなく、類似アミノ酸を考慮にいれた相同性は植物のそれとも相同性を示した。このことから、ORF1

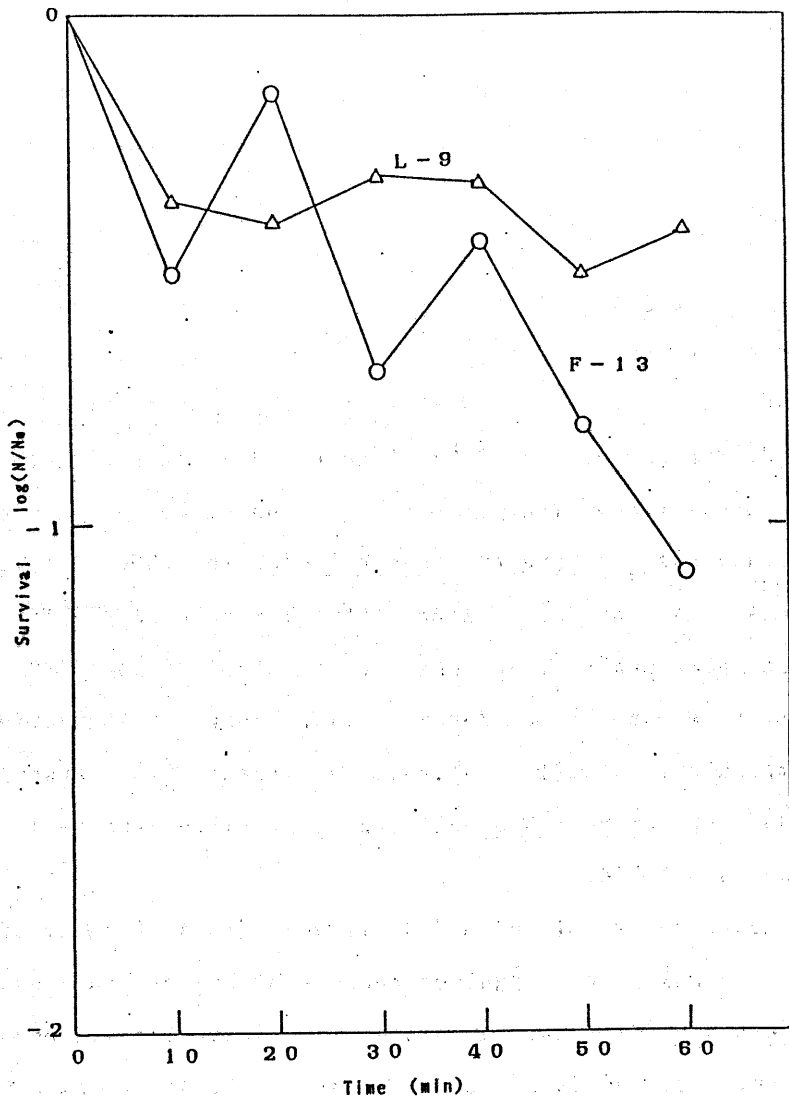
は P e h の構造遺伝子であると考えられる。従って、4個のアイソザイムは O R F 1 に別なペプチドが結合して形成されたものであると考えざるを得ない。これは、全く新しいアイソザイム生産機構であり注目される。尚、P e h の大腸菌クローンは弱いながらも植物組織崩壊能力があり、P e h も発病因子であることが判った。

参考文献

- 1) Boucher, C., P. Barberies, A. Trigalet, and D. Demery (1985) Transposon mutagenesis of Pseudomonas solanacearum: Isolation of Tn5-induced avirulence mutants. J. Gen. Microbiol. 131:2449-2457.
- 2) Tsuyumu, S., K. Tanaka, N. Furutani, Y. Takikawa and C. Boucher (1994) Genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv. citri. Proc. Internat. Conf. Plant Pathogenic Bacteria 8: (in press)
- 3) Boucher, C., F. V. Gijisegem, P. A. Barberis, M. Alart, and K. C. Zsche (1987) Pseudomonas solanacearum genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. J. Bacteriol. 169:5626-5632.
- 4) Mukhopadhyay, P., J. Williams, and D. Mills (1988) Molecular analysis of a pathogenicity locus in Pseudomonas syringae pv. syringae. J. Bacteriol. 170: 5479-5488.
- 5) Loubens, I. L. Deharbieux, A. Bohin, J. -M. Lacroix and J. -P. Bohin (1993) Homology between a genetic locus (mdoA) involved in the osmo regulated biosynthesis of periplasmic glucans in Escherichia coli and a genetic locus (hrpM) controlling pathogenicity of Pseudomonas syringae. Mole. Microbiol. 10:1-12.
- 6) Inokuchi, K., N. Mutoh, S. Matsuyama, and S. Mizushima (1982) Primary structure of the ompF gene that codes for a major outer membrane protein of Escherichia coli K-12. Nuc. Acids res. 10:6957-6968.
- 7) Matsuyama, S., K. Inokuchi, and S. Mizushima (1984) Promoter ex-

- change between ompF and ompC, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 158:1041-1047.
- 8) Chai, H. B., and N. Doke (1987) Superoxide anion generation: A response of potato leaves to infection with Phytophthora infestans. Phytopathology 77:645-649.
 - 9) Lindgren, P. B., R. Frederick, A. G. Govindarajan, N. J. Panopoulos, B. J. Staskawicz, and S. E. Lindow (1989) An ice nucleation reporter gene system: Identification of inducible pathogenicity genes in Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. The EMBO J. 8:1291-1301.
 - 10) Collmer, A., and N. T. Keen (1986) The role of pectic enzyme in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. 25:405-430.
 - 11) Dri, A.-M., and P. L. Moreau (1993) Phosphate starvation and low temperature as well as ultraviolet irradiation transcriptionally induce the Escherichia coli LexA-controlled gene sfiA. Mole. Microbiol. 8:697-706.
 - 12) Jhoncon, J., M. Miura, and S. Tsuyumu (1994) Cloning of a region encodes multiple polygalacturonases of Erwinia carotovora subsp. carotovora EC1. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60: (in press)
 - 13) Jhoncon, J., F. Sakai, and S. Tsuyumu (1994) Determination of nucleotide sequence of a region producing multiple polygalacturonase from Erwinia carotovora subsp. carotovora. Ann. Phytopath. Soc. Japan 60: (in press)

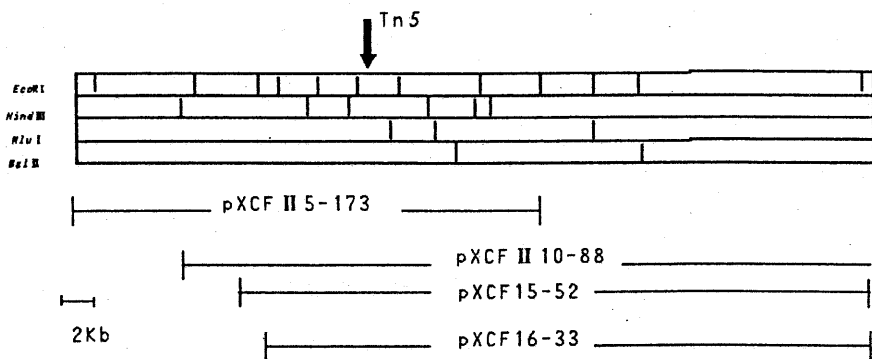
☒ 1



Survival response of Tn-5 induced non-pigmented mutant to Visible radiation

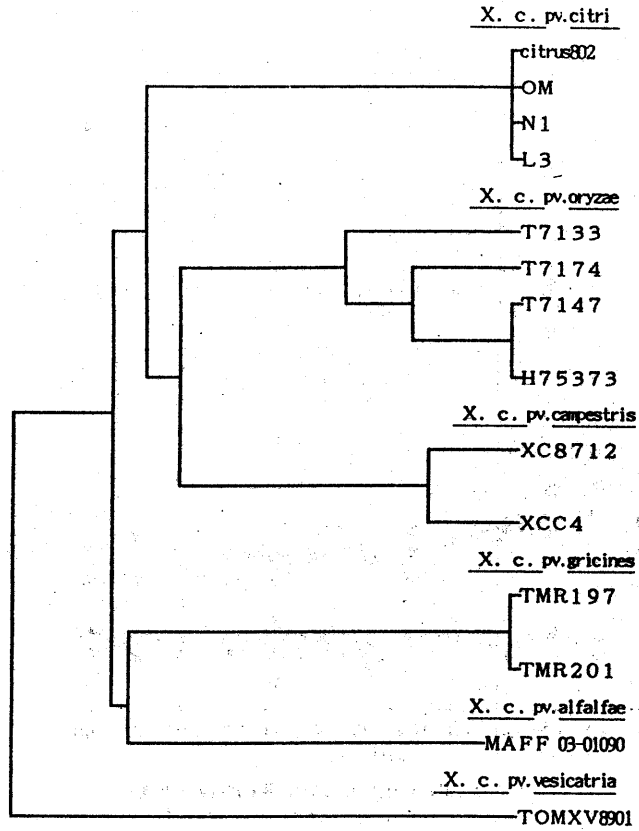
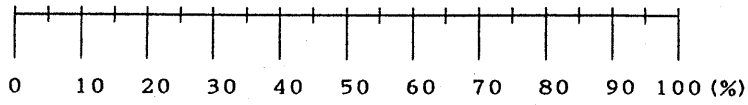
L-9:wild type F-13:non-pigmented mutant

☒ 2



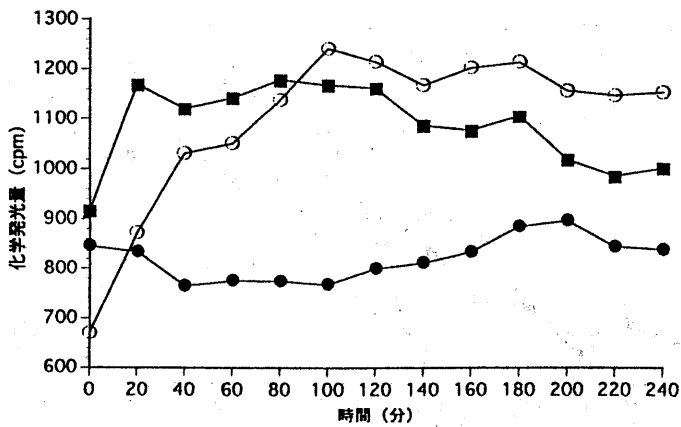
locus IIIの制限酵素地図

図 3



RFLP解析法における類似性に基づいて得られた樹形図

図 4



NA-1 添加後の化学発光

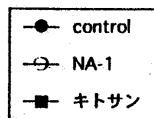


図 5

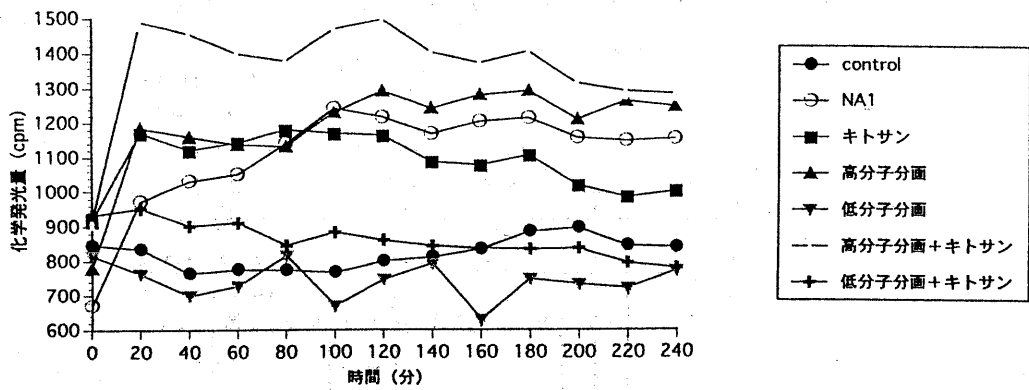


図 6

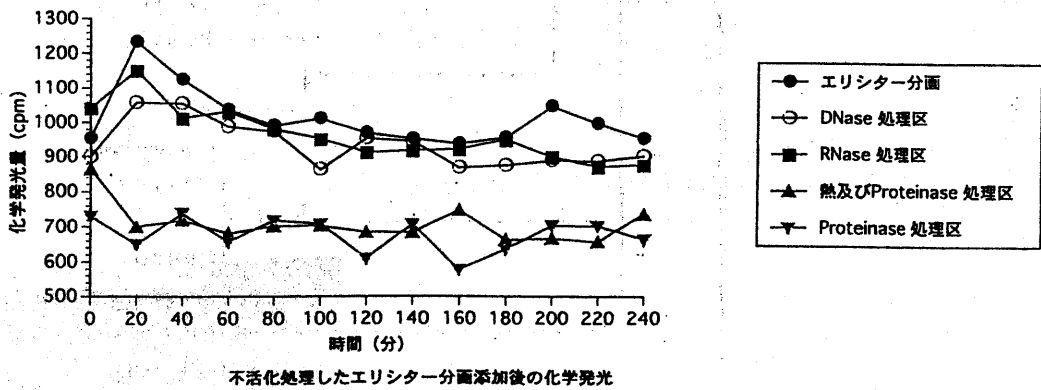


図 7

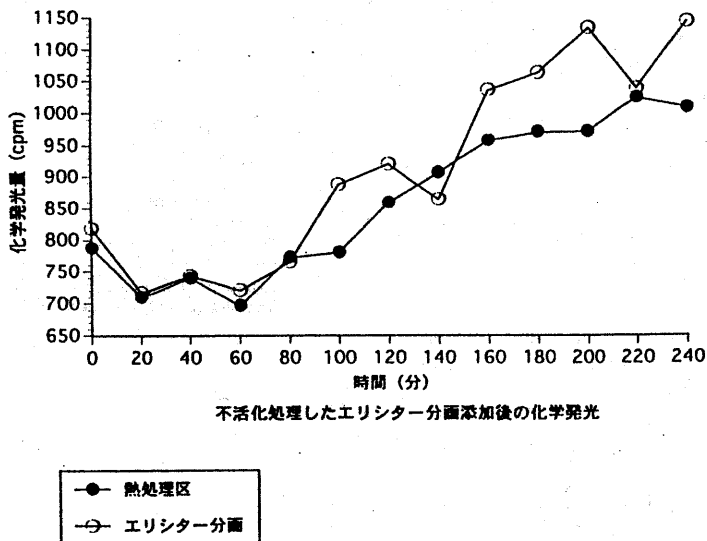
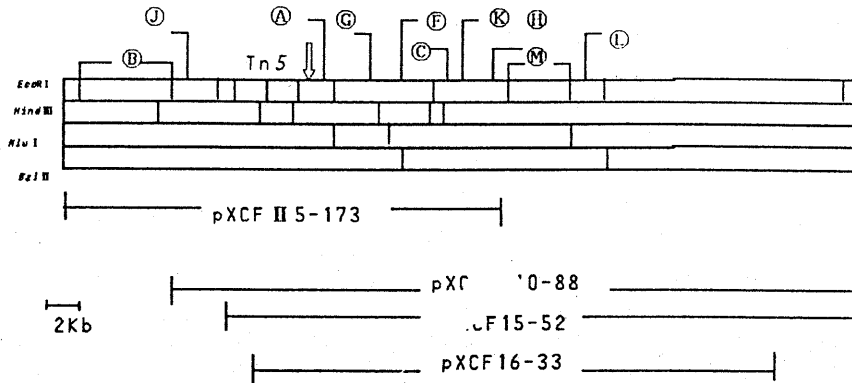


図 8



locus III における *TnphoA* 挿入位置

図 9

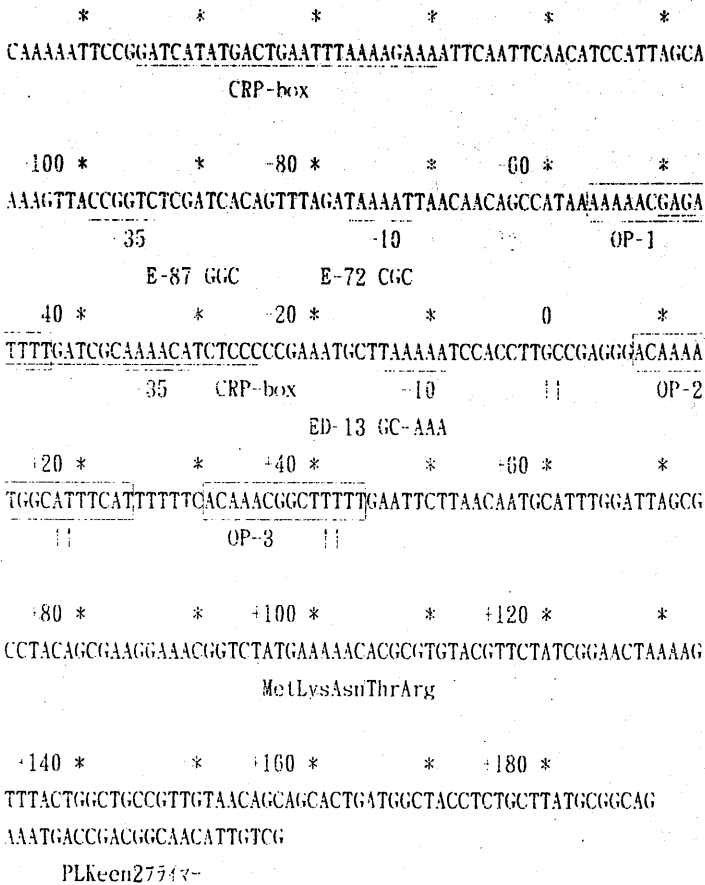
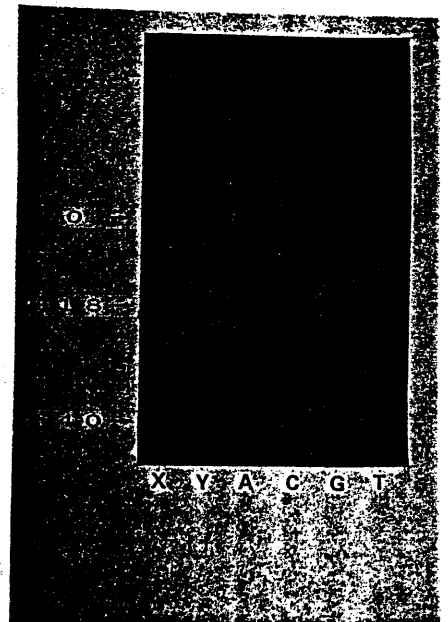


図 10



ヘラクチン酸リナーゼ遺伝子 (*pe1E*) の 5' 末端制御領域

1 フロモーター 1 による転写開始部位

2 フロモーター 2 による転写開始部位

1 CTG TGA AGA GAG GAA
 16 AAG CTT ACC ACC CGC TGG CTT CTG CGC ATT GAC GGG ATT CGT TTT
 HindIII
 61 GTT TCC ACG TTT CGT TGA TAC TTC ATT TAA TTT TTT GGT GAT ATT
 106 TTA ACC ATG CGT AAA GTT GAA TGC TTT CCG AAT AAG CAT TGG AAT
 151 AAT TTT ATG TAA ATG GAC TTT TCA TTA ATC TAC ATA GGC ATG TGT
 196 GAC AAT TTT TAG TTT CTA TAA AGG CGT TTT ATT TTT ATT ATT AAG
 -35 -10
 241 CAA AAT GAA AGC GTA ATG CCT TTT GGG GAT GGA AAA GTT GTG GAT
 Kdgr
 286 GCT TAT AAG GTA AGG TTT GAC ATG GAA TAT CAA TCA GGC AAG CGA
 S.D. Met Glu Tyr Gln Ser Gly Lys Arg
 331 GTT TTA TCA TTA TCA CTG GGG CTT ATC GGT TTG TTT AGT GCA TCG
 Val Leu Ser Leu Ser Leu Gly Leu Ile Gly Leu Phe Ser Ala Ser
 376 GCA TTT GCT TCT GAT TCC CGA ACG GTG AGT GAA CCG AAA GCA CCG
 Ala Phe Ala Ser Asp Ser Arg Thr Val Ser Glu Pro Lys Ala Pro
 421 TCT TCC TGT ACG GTG CTT AAA GCG GAC AGT AGT ACG GCC ACG AGT
 Ser Ser Cys Thr Val Leu Lys Ala Asp Ser Ser Thr Ala Thr Ser
 466 ACA ATT CAA AAA GCG CTG AAT AAT TGC GGG CAA GGA AAA GCG GTA
 Thr Ile Gln Lys Ala Leu Asn Asn Cys Gly Gln Gly Lys Ala Val
 511 AAG CTG AGC GCA GGG AGT TCA TCC GTT TTT CTG AGC GGT CCG CTT
 Lys Leu Ser Ala Gly Ser Ser Ser Val Phe Leu Ser Gly Pro Leu
 556 TCT CTA CCT TCT GGC GTG AGC TTA TTA ATC GAC AAA GGG GTA ACC
 Ser Leu Pro Ser Gly Val Ser Leu Leu Ile Asp Lys Gly Val Thr
 601 CTA CGT GCT GTG AAT AAT GCC AAG TCT TTT GAA AAT GCG CCC TCA
 Leu Arg Ala Val Asn Asn Ala Lys Ser Phe Glu Asn Ala Pro Ser
 Ecot221
 646 TCC TGT GGC GTG GTG GAT ACA AAC GGT AAA GGC TGC GAT GCA TTT
 Ser Cys Gly Val Val Asp Thr Asn Gly Lys Gly Cys Asp Ala Phe

691 ATT ACC GCC ACA AGC ACG ACG AAT AGC GGA ATC TAT GGG CCG GGC
 Ile Thr Ala Thr Ser Thr Thr Asn Ser Gly Ile Tyr Gly Pro Gly
 HindIII
 736 ACC ATT GAT GGA CAG GGG GCC GTG AAG CTT CAG GAT AAA AAG GTG
 Thr Ile Asp Gly Gln Gly Ala Val Lys Leu Gln Asp Lys Lys Val
 781 AGC TGG TGG GAT CTG GCT GCC GAT GCC AAA GTG AAA AAG TTA AAA
 Ser Trp Trp Asp Leu Ala Ala Asp Ala Lys Val Lys Lys Leu Lys
 826 CAG AAT ACC CCC CGG CTG ATT CAG ATT AAT AAG AGC AAG AAT TTC
 Gln Asn Thr Pro Arg Leu Ile Gln Ile Asn Lys Ser Lys Asn Phe
 871 ACG CTG TAT AAC GTC TCT CTC ATT AAT TCT CCG AAC TTC CAT GTG
 Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Ile Asn Ser Pro Asn Phe His Val
 916 GTG TTC AGC GAT GGT GAC GGT TTC ACC GCG TGG AAA ACC ACG ATC
 Val Phe Ser Asp Gly Asp Gly Phe Thr Ala Trp Lys Thr Thr Ile
 961 AAA ACG CCA TCT ACC GCC AGA AAC ACC GAC GGT ATC GAT CCG ATG
 Lys Thr Pro Ser Thr Ala Arg Asn Thr Asp Gly Ile Asp Pro Met
 1006 TCA TCA AAG AAC ATC ACC ATT GCC CAC AGT AAT ATT TCG ACG GGC
 Ser Ser Lys Asn Ile Thr Ile Ala His Ser Asn Ile Ser Thr-Gly
 1051 GAC GAT AAT GTG GCG ATC AAA GCC TAT AAG GGG CGT TCT GAG ACA
 Asp Asp Asn Val Ala Ile Lys Ala Tyr Lys Gly Arg Ser Glu Thr
 1096 CGC AAT ATT TCC ATT TTG CAT AAT GAA TTT GGA ACG GGA CAT GGC
 Arg Asn Ile Ser Ile Leu His Asn Glu Phe Gly Thr Gly His Gly
 1141 ATG TCG ATC GGT AGC GAA ACG ATG GGA GTT TAT AAC GTG ACG GTC
 Met Ser Ile Gly Ser Glu Thr Met Gly Val Tyr Asn Val Thr Val
 1186 GAT GAT CTG GTT ATG ACT GGC ACC ACG AAT GGC TTA CGT ATT AAA
 Asp Asp Leu Val Met Thr Gly Thr Thr Asn Gly Leu Arg Ile Lys
 NaeI
 1231 AGC GAC AAA TCG GCA GCC GGC GTT GTC AAT GGT GTT CCG TAT AGC
 Ser Asp Lys Ser Ala Ala Gly Val Val Asn Gly Val Arg Tyr Ser
 1276 AAC GTA GTC ATG AAG AAC GTG GCG AAA CCG ATC GTG ATT GAC ACG
 Asn Val Val Met Lys Asn Val Ala Lys Pro Ile Val Ile Asp Thr

1321 GTA TAT GAG AAA AAA GAG GGA AGT AAT GTT CCT GAC TGG AGC GAC
 Val Tyr Glu Lys Lys Glu Gly Ser Asn Val Pro Asp Trp Ser Asp
 1366 ATT ACG TTT AAG GAT ATT ACG TCT CAA ACC AAA GGT GTG GTA GTG
 Ile Thr Phe Lys Asp Ile Thr Ser Gln Thr Lys Gly Val Val Val
 BsmI
 1411 CTG AAC GGC GAG AAT GCG AAA AAG CCG ATA GAA GTG ACG ATG AAG
 Leu Asn Gly Glu Asn A Lys pro Ile Glu Val Thr Met Lys
 1456 AAC GTC AAA CTG ACC GAC AGC ACA TGG CAA ATC AAG AAC GTC
 Asn Val Lys Leu Thr Ser Asp Ser Thr Trp Gln Ile Lys Asn Val
 1501 AAC GTT AAG AAA TAA CGC AGT TAC AAA ATC GTT CTA TTA ACT GAT
 Asn Val Lys Lys ***
 1546 CGT ACC CCG TGG CGC TGC TGT TGT TTG TGC ACT CGT TGT TAC GTT
 ApaLI
 1591 GCG AGA GTT TAA CCT GCA CGC AGC GCT TCA TTG ACC TTA TTC AGC
 1636 GTT TAA TCA GAA TAG TCC ATC ACG CTT TTT TGA CCG GTT TTT ATG
 1681 TCC ACG CTG GCG ACC ATG CCC GGC ACG ATG GGG AAT TTT TCC CCG
 1726 GCT TTG TTG GTC AGT TCC GGC TGT GTG GTG CGC ACA TAG ATC CGA
 1771 ATA ATA AAA CTT GAT CTC GCC TTA CTT CGG CCT G

表 1

Pathogenicity of Tn-5 induced non-pathogenic mutants

Strain	Pathogenicity			Generation Time(h)	Tn-5 ^d
	Hyperplasia	Yellowing	Viability		
L-9	+	++	10 ⁸ <	0.68	0
F-1	-	+	2 × 10 ⁷	0.82	1
F-2	-	+	2.2 × 10 ⁷	0.6	1
F-3	-	±	1.5 × 10 ⁷	0.93	1
F-4	-	++	10 ⁸ <	0.6	1
F-5	-	±	6.9 × 10 ³	0.88	2
F-6	-	+	6.5 × 10 ⁷	0.66	1
F-7	-	±	6 × 10 ⁴	0.9	2
F-8	-	-	2 × 10 ⁴	0.56	1
F-9	-	±	1.6 × 10 ⁷	0.88	1
F-10	-	±	4.4 × 10 ⁵	0.93	1

a: +, typical hyperplasia symptom - , no hyperplasia symptom

b: ++, much strong response +, strong response

±, weak response - , no response

c: Bacterial number in a leaf disk (0.7cm) was counted by plating the dilutions 3 weeks after inoculation

d: The number of Tn-5 insertions in genomic DNA which were analyzed by southern blot hybridization with pRZ102

表 2

各ベクターのTriparental matingによるF-9への接合効率

プラスミドベクター	受容菌数 (F-9)	接合体数	接合効率
pSUP205	6.6×10^7	5×10^3	7.5×10^{-5}
pSF6	6.0×10^8	9.2×10^7	1.5×10^{-1}

$$\text{*接合効率} = \frac{\text{接合体数}}{\text{受容菌数}}$$

表 3

各*X.c. pathovar*におけるhrp領域を有するコスミドクローンに対する相同性

学名	使用菌株	pXCF13-38		pXCF13-44	
		体積値	相同性(%)	体積値	相同性(%)
<i>X.c. pv. citri</i>	L9	499167		502997	
	citrus802	427560	85.65	455818	90.62
	OM	307893	61.68	417476	83.00
	N1	386639	77.46	433054	86.09
	L3	351400	70.39	425545	84.60
<i>X.c. pv. oryzae</i>	T7174	193213	38.71	274217	54.52
	T7147	114660	22.97	235801	46.88
	T7133	207084	41.48	249447	49.59
	H75373	101496	20.33	206492	41.05
<i>X.c. pv. campestris</i>	XC8901	290713	53.67	404734	79.93
	XCC4	101123	18.67	144963	28.63
<i>X.c. pv. vesicatria</i>	TOMXV8901	88681	16.37	123735	24.44

計算方法は以下の式に従う

$$F = \frac{V_{\text{strain}}}{V_{L-9}} \times 100 \quad (\%)$$

V_{strain} : 各菌株における体積値V_{probe} : L-9における体積値

表 4

RFLP検定による非病原性Xanthomonas属細菌における類似性

	Car 6	lettuce79-2	lettuce79-4	クス3by	ダイズX8103	XCANNAG
Carl	100	36	0	46	36	29
	100	40	22	33	36	—
Car6		36	0	46	36	29
		40	22	33	36	—
lettuce79-2			0	43	50	25
			0	66	73	—
lettuce79-4				43	17	0
				22	25	—
クス3by					71	20
					92	—
ダイズX8103						25
						—

上段; pXCF13-38, 下段; pXCF13-44, 単位; %

断片パターンにおける類似性の算出方法

オートラジオグラフィーの後、X線フィルム上には様々な位置に様々な濃さのバンドが存在するが、ここでは位置(断片パターン)に関するデータ処理を行う。

誤差±2mmで他のレーンにみられるバンドと一致するバンドおよび比較に用いたバンドの数の合計を記録して、次の計算式に従って処理された。

- 2つのレーンx, yにおいて n_{xy} ; レーンyでのバンドに一致したレーンxでのバンドの数
- $F = 100(n_{xy} + n_{yx}) / (n_x + n_y)$ n_{yx} ; レーンxでのバンドに一致したレーンyでのバンドの数
- $= 200n_{xy} / (n_x + n_y)$ n_x ; レーンxでのバンドの数
- n_y ; レーンyでのバンドの数
- F; 類似性 (%)

表 5

X. c. pv. citri 野性株及び病原性欠損変異株の
テトラサイクリンに対する最少生育抑制濃度

菌株	最少生育抑制濃度 (MIC)*1
L-9	10 μ g/ml
F-1	10 μ g/ml
F-2	10 μ g/ml
F-3	10 μ g/ml
F-4	10 μ g/ml
F-5	35 μ g/ml
F-6	10 μ g/ml
F-7	35 μ g/ml
F-8	10 μ g/ml
F-9	10 μ g/ml
F-10	10 μ g/ml

(*1) LB培地で一晚培養後、 10^8 , 10^7 , 10^6 cells/mlとなるように調整し、テトラサイクリンの各濃度に調整したプレート上に10 μ lずつ滴下する。30℃で2~7日間培養した後、生育の有無を観察した。

表 6

X. c. pv. citri 野性株及び病原性欠損変異株のク
ロラムフェニコールに対する最少生育抑制濃度

菌株	最少生育抑制濃度 (MIC) (*1)
L-9	12 μ g/ml
F-1	12 μ g/ml
F-2	12 μ g/ml
F-3	12 μ g/ml
F-4	12 μ g/ml
F-5	36 μ g/ml
F-6	12 μ g/ml
F-7	36 μ g/ml
F-8	12 μ g/ml
F-9	12 μ g/ml
F-10	12 μ g/ml

表7 locus IIIにおけるTnphoA遺伝子融合の*E. coli*
CC118内でのアルカリフォスファターゼ活性

菌株	LB	M9	hrp*2
CC118	1.77*1	0.79	0.47
CC118(fusion A)	4.70	1.87	0.45
CC118(fusion B)	4.47	0.76	0.36
CC118(fusion C)	3.86	0.86	0.40
CC118(fusion D)	4.17	0.19	0.34
CC118(fusion E)	9.42	1.36	1.36
CC118(fusion F)	3.66	1.30	1.76
CC118(fusion G)	3.91	1.62	1.55
CC118(fusion H)	3.47	0.79	1.62
CC118(fusion I)	4.52	1.59	1.37
CC118(fusion J)	3.96	1.42	1.76
CC118(fusion K)	3.58	0.49	1.94
CC118(fusion L)	3.63	1.44	1.43
CC118(fusion M)	4.17	1.15	1.75

(*1) $OD_{420} \times V_x \times T_x$
units = 1000 × $\frac{OD_{420}}{OD_{600} \times V_x \times T_x}$
Vx: 反応量 (ml)
Tx: 反応時間 (min.)

各培地でほぼOD₆₀₀=0.8まで培養し、反応に供した。トルエン処理後、PNPPと反応させOD₄₂₀を測定した。

(*2) hrp培地

50mM K-phosphate buffer, 7.6mM (NH₄)₂SO₄, 1.7mM NaCl, 1.7mM MgCl₂, 10mM mannitol, 10mM fructose, pH5.7 調整後、120℃, 1.2気圧, 15minオートクレーブを行う。

表8

locus IIIにおけるTnphoAによる遺伝子融合プラスミドの*P. s. pv. actinidiae* kw21でのアルカリフォスファターゼ活性

菌株	LB	M9	hrp
kw21	0.872*1	0.745	0.246
kw21(fusion A)	ND*2	ND	ND
kw21(fusion B)	ND	ND	ND
kw21(fusion C)	0.148	ND	ND
kw21(fusion D)	0.100	ND	ND
kw21(fusion E)	0.205	ND	ND
kw21(fusion F)	0.112	ND	ND
kw21(fusion G)	ND	λ	ND
kw21(fusion H)	0.177	ND	ND
kw21(fusion I)	0.140	ND	ND
kw21(fusion J)	ND	ND	ND
kw21(fusion K)	ND	ND	ND
kw21(fusion L)	ND	ND	ND
kw21(fusion M)	ND	ND	ND

*1 測定はTable 1と同様に行った。

*2 ND : not detected