学会賞受賞者講演

植物病原細菌の病原性関連因子に関する分子生物学的解析*

露 無 慎 二**

Shinji TSUYUMU**: Molecular Biological Analyses of Pathogenic Factors of Plant Pathogenic Bacteria

植物病原細菌は、宿主植物との複雑な相互作用を経て発病に導くまでに、多数の因子を必要とすることがトランスポゾンタグgingを用いた解析等によって明らかにされている。これらの因子は、直接病徴発現を司る因子（発病因子）と、植物体内において抵抗性反応を回避しながら細菌が生存、増殖するために必要な因子（広義の病原性関連因子）とに大別される。従って、植物病原細菌による発病機構を解明するためには、まず、広範な病原性関連因子を探索することが重要である。また、全ての生物分子が必要な時に、必要なだけ生産されるように精巧に制御されていることを考えると、病原性関連因子の生産も植物体内の感染の場で巧妙に制御されているはずである。病原性関連因子を探索すると同時に、これらの因子の生産制御機構についても解明することが重要である。このように多数の病原性関連因子を動的に解析することによって、植物病原細菌による発病機構の全貌が見えてくるであろう。

本研究では、まず、カンキツかいよう病菌をモデル系として新しい病原性関連因子の探索を行い、これら因子の性状、機能について調べた。また、病原性関連因子の動的解析については、軟腐性 *Erwinia* 属細菌の発病因子であるペクチナーゼをモデル系として、その生産制御機構について解析を行った。以下に、これらの結果について述べる。

1. 発病因子

発病因子として、軟腐性 *Erwinia* 属細菌の生産する各種ペクチナーゼに着目した。本酵素群は植物細胞間隙に存在するペクチン質を分解するが、植物病原菌ばかりでなく、多くの非植物病原菌によっても生産される。しかし、これらの酵素は生化学的な性状に差異がないことから、生産制御機構に違いがあると予想された。

(1) ペクチン酸リアーゼの生産制御機構

軟腐性 *Erwinia* 属細菌は、他の菌に比べて非常に大量の

ペクチン酸リアーゼ（PL）を生産する。そこで、PLの生産制御機構について解析することから始めた。その結果、「基質分解産物誘導機構」（Product Induction Mechanism）と呼ばれる、最も基本的な制御機構が発見された。即ち、PLの基質であるペクチン酸が細菌の周辺に存在する時、非誘導的にわずかに生産されたPL等の酵素によってペクチン酸が分解・代謝されて真の誘導物質（True Inducer）になり、これがPL生産遺伝子（*pel*）の転写を活性化する信号となるというものである。具体的には、ペクチン酸の代謝産物の一つである2-keto-3-deoxy-glucuronate (KDG) が負の制御因子KdgRに結合すると、アロステリック効果によりKdgRがPL生産遺伝子（*pel*）上流領域に結合できなくなることにより、転写が開始されるというものである。しかし、この制御機構だけでは、PL生産誘導が進み大量のPLが生産されるようになった時に不都合が生じる。即ち、大量にPLが生産、分泌されると、より活発にペクチン酸が分解され、もはやPLを必要としなくなるともかわらず、細菌はPLの生産を高め続けることになってしまう。この不都合を回避するため、上記細菌群は「自己カタボライト抑制機構」（Self Catabolite Repression Mechanism）を持っている。即ち、基質が分解され、代謝産物が蓄積されるようになると、環状AMP (cAMP) の濃度が低下する。cAMPは、cAMP結合タンパク質(cAMP recognition protein, CRP)を活性化することにより、RNAポリメラーゼの、種々遺伝子のプロモーター領域への結合を助け、転写を可能にする。従って、PLが大量に生産されるようになると、誘導物質の濃度が高まるにもかかわらず、*pel*の転写が抑制されてしまう。このような制御機構は、その後、セルラーゼなどの高分子分解酵素においても主要な制御機構として働いていることが証明されている。

軟腐性 *Erwinia* 属細菌では、基質の他に植物抽出液が培地中に存在すると、PLの生産はさらに高められる。著者ら

* 平成10年5月20日 平成10年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

** 静岡大学農学部 Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan

は、この PL の Hyperinduction (超誘導) を司る新たな制御因子をゲルシフトアッセイを駆使して単離し、これを生産する遺伝子 (*pir*) をクローニングすることに成功した。この制御因子は、植物体内における本細菌グループによる活発な PL 生産の謎を解く制御因子である。*pir* の翻訳産物である正の制御因子 Pir (Plant inducible regulator) は、上記 Product Induction 機構に関与する負の制御因子である KdgR と *pel* 遺伝子の上流における結合を競い合うことが *in vitro* の結合競合実験で示された。この結果より、*pel* の上流領域に結合している KdgR が基質の分解産物により取り除かれ始めると、正の制御因子 Pir が結合できるようになることによって、PL の生産が超誘導に導かれることが示唆された。実際、上記病原細菌の *pir* 遺伝子にマーカーエクステンジによって変異を導入すると、基質と植物抽出液の存在下においても、PL の Hyperinduction が出来なくなることが確認された。なお、この *pir* 欠損変異株は、低菌密度の接種条件下で野生型に比べ病原性が弱くなっていた。このことから、Pir は病原性発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) その他のペクチナーゼ

軟腐性 *Erwinia* 属細菌は PL 以外のペクチナーゼをも生産する。大内らと、伊崎らは、DNA 損傷物質存在下で培養すると、蔬菜類の軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) が大量のペクチンリアーゼ (PNL) を生産することを報告していた。著者らは、本細菌を種々植物体に接種すると、PNL の生産が高められることが観察されることから、植物体中には DNA 損傷物質が含まれるのではないかと考えた。そこで、種々野菜、果物の熱抽出液について、Rec アッセイにより DNA 損傷活性を調べたところ、供試した植物体のほとんどがこの活性を持っていた。これによって、植物体内 DNA 損傷物質が PNL 生産を誘導出来ることが示された。

なお、植物体内ではペクチン質は部分的にエステル化されたペクチンとして存在する。PNL と PL を共存させると、ペクチンは完全に分解されるようになる。このことから、軟腐性 *Erwinia* 属細菌が PL の他に PNL を植物体内で生産すれば、両酵素の協同作用によって植物体内のペクチンの低分子化が可能になり、細菌の組織崩壊能力が強められると考えられる。また、低分子化された分解産物は植物細胞間隙における細菌の増殖のための炭素源として利用可能となるので、病原細菌の植物体内増殖も助けるであろう。

蔬菜類の軟腐病菌は、3番目のペクチナーゼとして *endo*-ポリガラクトツロナーゼ (Peh) を生産する。著者らは、本酵素を生産する 1.2 kbDNA 断片を持つクローンを単離した。この DNA 断片には 1 つのメジャーな翻訳領域しか存在しないにもかかわらず、本クローンは複数のアイソザイ

ムを生成することが判った。これは、単一の翻訳産物が他の分子 (恐らく、タンパク質) と結合することによって複数のアイソザイムとなると考えられた。実際、この翻訳産物を純化し、これに軟腐病菌のエクストラクトを加えると、pI の異なる複数のアイソザイムが形成されるようになった。この新しいアイソザイム生成機構は、植物病原細菌が微妙な環境の変化に適応するための翻訳後の巧妙な工夫として機能しているのであろう。

2. 広義の病原性関連因子

広義の病原性関連因子については、カンキツかいよう病菌をモデル系として、主に遺伝子としてとらえる研究を行い、以下のような新しい病原性関連因子が発見された。

(1) 新規環状グルカン

カンキツかいよう病菌およびナス科植物青枯病菌は、それぞれ 16 個および 13 個の決まった数のグルコースが 1 カ所のみ α -1,6 結合で、残りは β -1,2 結合である新規環状グルカンを生産することが、Bohin らとの共同研究から明らかとなった。根頭がんしゅ病菌や根粒細菌の β -1,2 結合のみからなる環状グルカンは、細菌の植物細胞への吸着を司ることが示されているが、カンキツかいよう病菌の環状グルカンは、植物の動的抵抗反応を抑制するサプレッサー活性を持つという結果が得られている。カンキツかいよう病菌を始めとした *Xanthomonas* 属細菌をタバコなどの非宿主植物の細胞間隙に接種した際、他の植物病原細菌の場合に比べ過敏反応が誘導されにくかったり、誘導されても遅れることが知られているが、このサプレッサー活性によるものではないかと考えている。

(2) 植物体内増殖を司る因子

上記、根頭がんしゅ病菌および根粒菌の環状グルカンの分泌関連遺伝子の共通領域をプローブとして、これとハイブリダイズするクローンが得られた。このクローンに Tn3*Spice* を挿入させたところ、通常の菌密度の接種ではカンキツに発病させるが、低菌密度接種条件下では全く発病させることが出来なくなる変異株が得られた (植物体内における増殖が出来なくなっていた)。カンキツかいよう病菌が発病にいたるまでに、細菌の増殖が必要なのだと考えられる。本遺伝子は、ホモロジーサーチからは *hrp* 遺伝子群等の既報のどの植物病原性関連遺伝子とも相同性を示さなかったことから、新しい病原関連遺伝子と言える。

(3) *avr* 様病原性関連因子

Xanthomonas 属細菌の多くの非病原力 (*avr*) 遺伝子は、それらの中央部に 15~30 個の 102 塩基を 1 単位とする繰り返し配列を持つ。興味深いことに、明確なレース分化がないと考えられているカンキツかいよう病菌においても、この *avr* 遺伝子と相同性を示す領域が 3 カ所、いずれもプラスミド上に存在することが明らかになった。著者らは、

これらの *avr* 様遺伝子 (*apl* 遺伝子と命名) をクローニングし、これらの塩基配列を決定した。その結果、各 *apl* 遺伝子 (*apl1*, *apl2*, *apl3*) は、上記繰り返し配列部に違いが見られるものの、ロイシンリッチ領域、核局在性領域 (Nuclei Recognition Sequence) などを含むその他の翻訳領域ばかりでなく、翻訳上流 247 塩基と翻訳下流領域 111 塩基まで完全に塩基配列が一致していた。しかも、これらの共通領域は逆向きの繰り返し配列 (IR) で終わっていることが明らかになった。このことから、カンキツかいよう病菌の *apl* 遺伝子を含む DNA 断片は挿入配列として自由に移動することが予測された。さらに、これらの複数の *apl* 遺伝子間内の相同組換えにより繰り返し配列部が変化することが、継代培養後のプラスミドの解析から明らかになった。*X. campestris* pv. *vesicatoria* では、上記 *avr* 遺伝子の繰り返し配列を変化させることによって、レース分化が変わることが報告されている。多くの *Xanthomonas* 属細菌は *apl* と同じ構造を持つ *avr* 遺伝子を複数持つことが知られている。これらの細菌内では、相同組換えによってこれらの *avr* 遺伝子が高頻度に変化する可能性が示された。

なお、*apl1* をカンキツかいよう病菌の病原性欠損変異株に導入すると、病原性を完全に回復させた。*apl2* は病原性を回復させたものの、病徴発現まで2倍の日数を要し、*apl3* はまったく病原性を回復させることが出来なかった。この結果から、*apl* 遺伝子内繰り返し配列が病徴発現に際しても重要な領域であることが確認された。また、病徴発現に必要な繰り返し部の二次構造についても情報を得ることが出来た。

apl 遺伝子はいずれも核局在性配列を持つことから、今後 *apl1* 遺伝子産物の植物核内のターゲット分子を見つけて、それとの反応様式を研究することにより、カンキツかいよう病菌の発病機構の解明に向けて大きく前進するであろう。さらに、この研究は、*Xanthomonas* 属細菌の *avr* 遺伝子による品種特異的抵抗性発現機構にも重要な情報を提供するであろう。

3. 病原性関連因子の研究と病害防除

植物病理学は、植物病原体による被害を軽減して、食糧の安定供給を可能にするための応用学問である。著者も、この使命を念頭において上記のような研究を行ってきた。

しかし、すぐに農業生産の場で役に立つ成果を目指すというよりは、むしろ、発病機構を解明して究極的な病害防除策を完成させるための一里塚となることを目指している。とはいえ、結果として得られた成果や手法がすぐに農業生産の場で応用可能な場合がある。このような可能性には常に目を向けていたいと思う。

例えば、新しい病原性関連因子が見つければ、防除用薬剤のスクリーニングや、病害抵抗性植物作成のための細胞育種のためのターゲット分子を知ることが出来る。上記カンキツかいよう病菌の植物体内増殖を司る因子、植物核に病原性因子を送り込むためのタンパク質、植物核内の結合分子などは、上記のターゲット分子の候補である。また、多数の病原性関連因子を探索できれば、これらの因子の生産遺伝子をどのようなセットで持つのか、また、どのような遺伝子内のバリエーションを持つのか等をハイブリダイゼーションや PCR 法等によって調べることにより、迅速かつ正確な診断や同定が可能になるであろう。

また、病原性関連因子の植物体内における生産制御機構に関する情報は、病原性関連因子の作用を直接抑えるばかりでなく、それらの生産を抑える戦略を可能とする。著者らは、各種有機酸がペクチナーゼの拮抗阻害物質であり、この処理により蔬菜類軟腐病の発病を抑えることを見いだしたが、これは酵素活性阻害剤が PL の Product Induction をも阻害することをねらったから可能になった。さらに、その有効性を高めるためには、その後判明した PL の Pir による超誘導や PNL の DNA 損傷物質による誘導を抑える戦略を加えること等を提唱できる。

本研究を行うにあたり、終始ご指導を賜った静岡大学岡部徳夫、後藤正夫両名誉教授、近畿大学大内成志教授等の諸先生に深謝の意を表す。また、共同研究者として惜しみなうご協力をいただいた大内 昭、石井茂孝、故畑中千歳、伊崎和夫、N.T. Keen, A.K. Chatterjee, J. Robert-Baudouy, W. Nasser, J-P. Bohin, 尾崎克巳、塩谷 浩、牧野孝広、芹澤拙夫、加来久敏、落合弘和各博士を始めとした諸先生、先輩、友人に衷心よりお礼申し上げたい。さらに、静岡大学農学部植物病理学研究室の瀧川雄一助教授、学生諸君には、研究の喜びと苦しみを分かち合っていたいただいた。記して感謝いたしたい。