植物病原細菌による宿主認識の分子機構[†]

露 無 慎 二

(静岡大学農学部)

植物病原細菌による宿主植物の発病には 100 個以上の遺伝子が関与することがトランスポゾンタギングによって判明している⁽¹⁾。このことは、“発病因子の生産によって最終的に病徴を引き起こすまでの過程で、多くの病原性遺伝子が植物体内で順序正しく機能する必要がある”ということを意味し、感染機構に関する研究が新たな展開に入ったといえる。すでに、病原細菌のこれらの遺伝子産物の役割が分子遺伝学的手法を駆使して徐々に捉えられてきている。本稿では、各感染過程における代表的な病原性遺伝子の解析に関する最近の研究動向について述べる。

1. 病原細菌の植物への侵入

植物病原細菌は糸状菌とは異なり、植物の表層を貫通して侵入することができないので、気孔、水孔等の自然開口部や傷から侵入する。しかし、病原細菌にはこれらの侵入口のなかでもお好みがあることがよく知られている。したがって、侵入に際しても病原細菌と植物の間で特異的認識機構が存在するのではないかと考えられる。たとえば、ヒアシンス黄腐病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* は、単極性繊毛 (fimbriae) によって特異的に気孔に結合することが報告されている⁽²⁾。また、傷口から侵入する根頭がんしゅ病菌 *Agrobacterium tumefaciens* の場合は、傷口における癒傷反応物質が Ti プラスミド上の病原性 (*vir*) 遺伝子群の発現を誘導し、これらの翻訳産物が同プラスミド上にある領域 (T 領域) の切り出し、保護、植物の核への移行を司り、その結果、T 領域が植物染色体に挿入され、感染が成立する⁽³⁾。

2. 病原細菌の植物細胞への吸着

病原細菌が植物体内に侵入すると、病原細菌が植物細胞に吸着することが感染成立の条件となっている場合がある。上述の根頭がんしゅ病菌の場合、この吸着に関する遺伝子として *chvA* と *chvB* が捉えられている。それぞれ、環状 (1-2) β -D-グルカンの細胞膜通過性と生成に関する遺伝子である⁽⁴⁾。根瘤菌においても、同分子⁽⁵⁾の細胞膜通過性と生成に関する *ndvA* と *ndvB* 遺伝子が宿主植物細胞への吸着を司ることが報告されている⁽⁶⁾。これらの遺伝子に変異を導入すると、吸着能力をなくし、それぞれ発病あるいは共生できなくなる。最近、当研究室とフランスの Bohin 教授との共同研究から、カンキツかいよう病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *citri* が環状グルカンを生成すること、さらに本菌の全 DNA には上記 *chvA* と相同性を示す領域が存在することが明らかとなった⁽⁷⁾。環状グルカンを介しての病原細菌の宿主細胞への吸着が、本病原細菌による感染成立のための必要条件であるのかもしれない。また、他の病原細菌では、多くの動物の病原細菌と同様に、細菌表層の繊毛による宿主細胞への吸着を条件とする発病が報告されている。いずれのタイプの吸着も、宿主細胞表層にはこれらと特異的に結合するレセプターが存在すると考えられ、少なくともこれらの病原細菌の場合、宿主植物細胞との相互認識反応が存在するといえる。

3. 宿主と非宿主の判別

病原細菌の高密度懸濁液 (1×10^7 個/ml 以上) を植物の細胞間隙に注入すると、注入部位はまず水浸状を呈し、24時間以内に褐変(細胞壊死)を生じる。この反応は過敏反応 (Hypersensitive reaction, HR) と呼ばれ、この間に一連の植物の抵抗性反応が誘導され、接種した病原細菌は褐変部に閉じ込められ、急速に死滅する⁽⁸⁾。しかし、病原細菌を本来の宿主植物に注入した場合は、HR は誘導されないで(植物の抵抗反応を回避して)、病原細菌は増殖を続け、やがて発病に至る。なお、非病原性細菌を同様に接種しても、HR や発病はみられない。最近、トランスポゾンタギングを用いて、非宿主植物に対す

[†] Molecular Mechanism for Recognition of Hosts by Plant Pathogenic Bacteria.
Shinji TSUYUMU (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422)

る HR 誘導能力を喪失する変異株が数多く分離されている。興味深いことに、これらの変異株は、宿主植物に対する病原性をも同時に喪失する。すなわち、この変異を受けた遺伝子は *hrp* (ハーブと読む) と呼ばれ、HR と病原性の双方を司る。これまで報告されている *hrp* 遺伝子は、通常約 25 kb の DNA 断片上にクラスターとして存在する。これらのクラスターは、同じ分類グループ内の病原細菌間で高い相同性を示す。各 *hrp* 遺伝子の直接の表現型はいまだ不明なものが多いが、これらの一次構造が次々と決定され、これより推定されるアミノ酸配列のホモロジー検索から、その機能が推察できるものも徐々に出てきている。たとえば、*Xanthomonas* 属細菌⁽⁹⁾と青枯れ病菌 *Pseudomonas solanacearum* グループの *hrp* 遺伝子領域は相同性を示すが、これらの翻訳産物のなかには、ヌクレオチド結合部位や ATPase のマグネシウム結合部位等のドメインがみられるものや、*Yersinia enterocolitica* の YScC や YScJ や腺ペストの病原菌 *Y. pestis* の LcrD 等の人間の病原細菌の分泌を司る病原性因子と高い相同性を示すものもある⁽¹⁰⁾。宿主が植物であれ、動物であれ、病原細菌と宿主細胞の間で共通の細胞認識機構が存在することを示唆する注目すべき結果である。

4. 品種特異性

病原細菌であっても糸状菌であっても、本来の宿主でありながら、品種によっては、病原細菌との接触によって HR が誘導され、発病に至らない場合がある(抵抗性品種)。抵抗性品種の栽培を続けると、これを犯す病原細菌のグループ(レース)が存在または出現することが知られている。Flor は、この現象を説明するため、病原菌側の優性遺伝子(非病原性遺伝子, avirulent gene, *avr*)と植物側の優性遺伝子(抵抗性遺伝子)の組合せで抵抗性反応が誘導されるという“遺伝子対遺伝子説”を提唱した⁽¹¹⁾。以後、多くの植物病原菌の品種特異性がこの説によって説明されてきた。しかし、双方の遺伝子がどのように反応しあうのかについてはまったく不明であった。最近、病原細菌の *avr* 遺伝子が次から次とクローニングされ、やにわにこの説の実体が捉えられるような雰囲気になってきた。

Pseudomonas syringae pv. *tomato* の *avrD* は、その性状が生化学的に捉えられた最初の例である。本遺伝子を発現ベクターにより大腸菌内で過剰転写させると、大腸菌クローンがトマトの抵抗性品種のみに HR を誘

図 1 シリンゴライドの構造。脂肪酸部にバリエーションがある。

1.	LTPDQVVAIASN	GGNQALETQRLLPVLCQAHG
2.	-----H	-----K-----D-----
3.	-----S	-----N-----K-----A-----D-----
4.	-----H	-----K-----D-----
5.	-----N	-----K-----D-----
6.	-----N	-----K-----D-----
7.	-----NN	-----K-----T-----
8.	-----H	-----K-----D-----
9.	-----N	-----K-----A-----
10.	-----H	-----K-----V-----D-----
11.	-----NN	-----K-----D-----
12.	-----A	-----H-----K-----D-----
13.	-----V	-----H-----K-----D-----
14.	-----V	-----N-----K-----A-----D-----
15.	-----V	-----H-----K-----D-----
16.	-----H	-----K-----

図 2 イネ白葉枯れ病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) の *avr* Xa10 遺伝子の翻訳産物中の繰返しアミノ酸配列。網かけ文字は可変領域。最初のペプチドと同じアミノ酸がみられる場合は一印を、異なるアミノ酸の場合のみ置換アミノ酸を1文字で記してある。

導するようになる。Keen ら⁽¹²⁾は、この系を用いて品種特異的 HR 誘導物質(エリシター)である新規物質 syringolide を発見した(図1)。少なくともこのグループの病原細菌では、*avr* 遺伝子産物がエリシター生産に関与することを明らかにしたものとして注目される。また、*Xanthomonas* 属細菌の *avr* 遺伝子は中央部に約 15 個の 102 塩基からなる繰返し配列が存在する。この繰返し部(若干のバリエーションはある)に1カ所存在する制限酵素 *BalI* 切断部位において部分分解と再結合による繰返し部の各種欠失変異を作成すると、抵抗性品種に対する HR 誘導能を失ったり、品種特異性が変化したりする⁽¹³⁾。このことから、翻訳産物中の 34 個のアミノ酸からなるペプチドが整然と繋がる部分(図2)が非病原性因子として、あるいは、その生産に重要な役割を果たしているといえる。著者らは、明確なレース分化がないといわれるカンキツかいよう病菌においても、上記繰返し配列が複数の箇所に存在することを見出して

る。上記繰返し部の機能について別な角度から情報を得るため、現在この領域の解析を行っている。

5. 発病遺伝子

病原細菌が植物の HR を回避すると、細胞間隙で徐々に増殖する。この増殖期間中に植物に病徴を呈するために必要な因子（発病因子）の生産が増強される。病原細菌の発病因子としては、植物組織崩壊酵素、毒素、植物ホルモン、植物導管閉塞因子などがある。いずれも植物体に接種することにより簡単にアッセイできることから、これらの因子は古くから生化学的に研究されてきた。また、植物病原性の分子生物学的研究分野でも真先に研究対象となり、分子レベルの制御機構まで解明されようとしている。ここでは、これらの研究のなかで最も解析が進んでいる植物組織崩壊酵素の 1 つペクチン酸リアーゼ (PL) の制御機構に関する研究を紹介する。

軟腐性 *Erwini* 属細菌の主要な発病因子 PL は、5~6 個のアイソザイムとして生産、分泌される。これらのアイソザイムの共通した制御機構は、(1) 基質であるペクチン質の分解産物の 1 つである KDG (2-keto-3-deoxygluconate) が誘導物質として、負の制御蛋白質 (KdgR) に結合して転写抑制を解除するという“分解産物誘導機構”⁽¹⁴⁾ と、(2) KDG が蓄積し、その代謝効率が高まると、cAMP 濃度が低下し、転写が抑制されるという“自己カタボライト抑制機構”⁽¹⁵⁾ である。しかし、各アイソザイムの生産量比をみると、感染する植物の種類によって異なる。ということは、上記基本的制御機構の他に別な制御機構が存在すると考えられる。最近これらの制御機構も明らかにされてきた。その 1 つが抗生物質などの二次代謝産物の生産制御機構として注目される“Auto-induction”である。すなわち、軟腐病菌はわずかな量の Autoinducer である homoserine-lactone を培地中に放出し続け、培養後期にこれが集積すると、細胞内に取り込んで PL の生産誘導を高める⁽¹⁶⁾。さらに、PL アイソザイム (PL_e) 生産遺伝子の解析から、本遺伝子の上流領域にはプロモータが複数存在し、メインなプロモータから転写が行われるためには、さらに上流にあるプロモータが開かれる必要があること、負の制御因子 (KdgR) のほかに正の制御因子が 2 つのオペレータに働くことによって制御されていることなどがわかってきた^(17,18)。このように、発病因子の生産は、各植物体内の種々条件によって複雑に制御されていると考えられる。したがって、感染後期においてさえ、病原細菌と植物細胞との相

互認識があるといえる。

おわりに

本稿では触れなかったが、これらの病原細菌側の遺伝子のなかには *avr* 遺伝子の場合のように、対応する植物側の遺伝子の解析も活発に進められている。今後、他の病原性遺伝子の解析とこれらに対応する植物側の遺伝子の解析が平行して行われていくことにより、植物感染機構解明に向けての研究が飛躍的に進展するものと期待される。

- (1) M. J. Daniels, J. M. Dow, and A. E. Osbourn : *Annu. Rev. Phytopathol.*, **26**, 285—312 (1988).
- (2) J. van Doorn, P. M. Boonkamp, and B. Oudega : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **7**, 334—344 (1994).
- (3) S. Jin, R. K. Prusti, T. Poitsch, R. G. Ankenbauer, and E. W. Nester : *J. Bacteriol.*, **172**, 4945—4950 (1990).
- (4) V. Puvanesarajah, F. M. Schell, G. Stacey, C. J. Douglas, and E. W. Nester : *J. Bacteriol.*, **164**, 102—106 (1985).
- (5) M. Abe, A. Amemura, and S. Higashi : *Plant Soil*, **64**, 315—324 (1982).
- (6) S. W. Stanfield, L. Ielpi, D. O'Brochta, D. R. Helinski, and G. S. Ditta : *J. Bacteriol.*, **170**, 3523—3530 (1988).
- (7) 近藤美子, 田中敬子, J.-P. Bohin, 露無慎二 : 日本植物病理学会大会講演要旨集, つくば, 1994, p. 89.
- (8) Z. Klement, G. L. Farkas, and L. Lovrekovich : *Phytopathology*, **54**, 474—477 (1964).
- (9) S. Tsuyumu, K. Tanaka, N. Furutani, Y. Takikawa, and C. A. Boucher : *Proc. Int. Conf. Plant Pathog. Bact.*, **8**, in press.
- (10) S. Fenselau, I. Balbo, and U. Bonas : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **5**, 390—396 (1992).
- (11) H. H. Flor : *Phytopathology*, **45**, 680—685 (1955).
- (12) N. T. Keen, J. J. Sims, S. Midland, M. Yoder, F. Jurnak, H. Shen, C. Boyd, I. Yucel, J. Lorang, and J. Murillo : in “Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions,” Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, pp. 211—220.
- (13) K. Herbers, J. Conrads-Strauch, and U. Bonas : *Nature*, **356**, 172—174 (1992).
- (14) S. Tsuyumu : *Nature*, **269**, 237—238 (1977).
- (15) S. Tsuyumu : *J. Bacteriol.*, **137**, 1035—1036 (1979).
- (16) S. Jones, B. Yu, N. J. Bainton, M. Birdsall, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra, A. J. R. Cox,

- P. Golby, P. J. Reeves, S. Stephens, M. K. Winson, G. P. C. Salmond, G. S. A. B. Stewart, and P. Williams : *EMBO J.*, **12**, 2477—2482 (1993).
- (17) S. Gold, S. Nishio, S. Tsuyumu, and N. T. Keen : *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **5**, 170—178 (1992).
- (18) 野村欽弥, N. T. Keen, 露無慎二 : 日本植物病理学会大会講演要旨集, つくば, 1994, p. 88.
-