

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 研究テーマ：イネ白葉枯病菌のポストゲノム 「ゲノム情報に基づく病原性関連分泌蛋白質の探索と発病制御への応用に向けて」平成 18-19 年度 | |
| 研究代表者（職氏名）：教授・奥 尚 | 連絡先 生命環境学部生命科学科 (E-mail 等)： |
| 共同研究者（職氏名）：京都府立大学大学院、准教授・津下誠治、宮崎大学・准教授・津野和宣 (独) 農業生物資源研究所・主任研究官・落合弘和 | |

【背景と目的】

イネ白葉枯病は *Pseudomonas* 菌科に属するイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) によって起こり、アジアをはじめとした世界各国でイネの最重要細菌病害として知られている。イネ白葉枯病菌は植物に感染する際、タイプⅢ分泌装置 (Type three secretion system : T3SS) と呼ばれる輸送経路を介してタンパク質 (エフェクター) を植物細胞内へ分泌すると考えられている。エフェクターには一般的に宿主植物に対する病原性の有無に関連するものがある。しかし、イネ白葉枯病菌ではどのようなタンパク質が植物細胞内へ分泌され、どのような作用を引き起こすかは明らかにされていない。

平成 18 年度研究ではイネ白葉枯病菌から T3SS 依存で植物細胞内へ分泌されるエフェクターを明らかにするため、イネ白葉枯病菌のゲノム情報から既知エフェクターと相同性が認められるタンパク質や分泌が推定されるタンパク質をコードする遺伝子を検索した。そして、それらのタンパク質とカルモジュリン依存アデニル酸シクラーゼ (Cya) との融合タンパク質を作成し、Cya レポーターシステムにより T3SS を介した植物細胞内への分泌について検討した。平成 19 年度は研究計画通り、分泌が確認されたエフェクタータンパク質コード遺伝子の破壊を行い、各遺伝子のイネへの病原性に及ぼす影響について確認した。

【実験方法】

平成 18 年度研究において、イネ白葉枯病菌のゲノム情報から既知エフェクターと相同性を示す少なくとも 21 を含む 209 の ORF を選抜し、その全ての ORF の推定プロモーター領域とその 5' 末端コード領域をそれぞれ約 450bp 含む遺伝子断片を PCR により増幅し、Cya との融合タンパク質を発現できる広宿主域プラスミド pHMCya にクローニングした後、イネ白葉枯病菌 T7174R 株を形質転換した。各形質転換体をイネおよびトマトに剪葉接種または注入し、接種部より 1cm の葉片を磨砕し、植物細胞内における cAMP の蓄積を調べた。その結果、少なくとも 16 について、イネおよびトマトへの分泌を認めていた。そこで先ず、これらが T3SS 依存で発現することを確認するため、T3SS 制御遺伝子変異株 74HrpX::Km に導入し、それらの菌体内でも発現の有無を Hrp 発現人工培地である XOM2 を用いて確認した。次に、HrpX 依存分泌が認められた全ての T3SS エフェクタータンパク質コード遺伝子を有する最短で 4kbp の断片をライブラリーから抽出し、その各々の目的 ORF の 5' 端より 450bp 以内の位置に対してトランスポゾン EZ::TN<Kan-2>を導入して変異導入プラスミドを構築し、イネ白葉枯病菌野生株 T7174R 株の目的遺伝子にマーカーエクステンジ法によって挿入変異を導入した。得られた各変異株は、イネ品種：日本晴、IR-24 および IR-24 に対して各々単独のイネ白葉枯病抵抗性遺伝子を導入されている near-isogenic line (IR-BB1、2、3、4、5、7、13 および 21) に剪葉接種を行い、野生株と変異株を接種した場合の病斑長を測定することにより、各エフェクターコード遺伝子の変異がその病原性に及ぼす影響を調べた。

【結果と考察】

X00037, X000103, X000148, X000315, X001488, X001669, X002210, X002402, X002875, X002877, X003150, X003222, X003803, X004042, X004134 および X004208 の発現は 74HrpX::Km 菌体中で顕著に低下するか失われることが判明し、各々の HrpX 依存分泌が確認された。すなわち、これら 16 はすべて T3SS エフェクターであることが証明できた。

X000148 は植物に過敏反応を引き起こすと考えられている AvrBs2 と、X000315 および X003150 は *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* において植物へ感染後の病原菌の増殖に関連していると考えられている XopN と、X001669 は *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* の HopAA1 (HopPtoA1) の一部と、X003222 は XopP と、X002875 および X004042 は XopX と、X004208 は XopQ と相同性を有していることは既に報告している。しかし、これら相同性を示したタンパク質を含むすべての植物

細胞内での詳細な働きは明らかとなっていない。そこで、これらエフェクターの病原性への関与を調べるために各エフェクター変異株を作出した。その結果、イネ品種 IR-24 に対してはほとんどのエフェクター変異株で野生株様の病原性が確認され、両者の間での顕著な差は認められなかった。しかし少なくとも X001669 および X004134 の変異株を接種した葉での病斑伸長の抑制が見られ、これらの病原性への関与が示唆された。また、IR-BB シリーズに対する変異株の病原性は全く変化せず、非病原力因子として機能するエフェクターは今回は見いだせなかった。一方、イネ品種：日本晴に対する接種試験では、IR-24 の場合とは異なり、その病斑伸長の抑制が、より明瞭な傾向であった。具体的な内容については、学会発表前なので、本項での公表は差し控えたい。

【今後の展開】

さらなる検討課題は多いが、近年、イネ品種：日本晴のゲノム情報の解読完了でその利用が可能になっており、エフェクターに対するイネの応答遺伝子の発現時期と発現量の解析は最も現実的な手法として期待される。

【講演発表】

- 1). 古谷綾子・川畑真人・中山 健・加来久敏・奥 尚・落合弘和・津下誠治 (2007) .イネ白葉枯病菌における HrpXo に発現制御される 6 つの新奇エフェクター. 日植病報 73:274.
- 2). 奥 尚・高岡美菜子・南部羽蘭・古谷綾子・落合弘和・加来久敏・津下誠治 (2007). イネ白葉枯病菌に見出される既知エフェクターホモログとそれらの植物細胞内への分泌. 日植病報 73:274.
- 3). Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Oku, T., (2007) Identification of novel HrpX regulons, candidates of pathogenicity-related genes, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. 3rd Asian Conference on Plant Pathology. August 20-23, 2007. Yogyakarta, Indonesia.
- 4). 古谷綾子・津下誠治・高岡美菜子・眞田春美・奥 尚・落合弘和 (2008). イネ白葉枯病菌のタイプ III エフェクターの病原性への関与. 平成 20 年度日本植物病理学会大会 (松江市) にて発表
- 5). 津下誠治・古谷綾子・高岡美菜子・眞田春美・奥 尚・落合弘和 (2008). イネ白葉枯病菌のタイプ III 分泌エフェクターの同定と性状解析. 平成 20 年度日本植物病理学会大会 (松江市) にて発表
- 6). 古谷綾子・落合弘和・奥 尚・津下誠治 (2008). イネ白葉枯病菌のタイプ III 分泌タンパク質の同定. 平成 19 年度 (第 81 回) 日本細菌学会総会 (京都市) にて発表

【招待講演・論文発表等】

- 1). 津下誠治・古谷綾子・落合弘和・奥 尚・津野和宣 (2007) .植物との相互作用に関与するイネ白葉枯病菌のタイプ III 分泌タンパク質. 日本植物病理学会第 24 回細菌病談話会論文集 pp. 100-108.
- 2). 古谷綾子・津下誠治・奥 尚・津野和宣・落合弘和 (2008). ゲノム情報を利用したイネ白葉枯病菌の植物感染機構の解析 ―病原性に関与するタイプ III エフェクターの同定― 日本植物病理学会植物感染生理談話会論文集 第 44 号: 21-30.
- 3). A. Furutani, T. Nakayama, M. Takaoka, H. Sanada, Y. Noguchi, T. Oku, K. Tsuno, H. Ochiai and S. Tsuge (2008). Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Submitted in Molecular Plant-Microbe Interaction