

# 学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 伊川 有美

題目: Studies on regulatory mechanisms of virulence-related genes in a plant pathogenic bacterium, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

(植物病原細菌イネ白葉枯病菌における病原力関連遺伝子の制御機構に関する研究)

植物病原細菌の病原力には、多くの遺伝子が関与している。それらの遺伝子の発現は、感染段階や環境刺激によって巧みに調節されているのみならず、互いに影響し合うことで複雑な遺伝子発現制御ネットワークを構築していることが明らかとなってきた。イネの重要病原細菌である白葉枯病菌の病原力には、感染特異的に発現する *hrp* 遺伝子群と、それによって構築され、宿主の防御応答の抑制・攪乱に関与するタイプIII分泌装置が必須である。本研究では、本遺伝子群の発現制御に関わる新規因子、および新規制御機構を明らかにしている。また、宿主体内で増殖する細菌は、種々のストレスに曝され、それらに対する耐性もまた病原力に重要である。ここでは、低酸素条件を感知する二成分制御系因子が、種々のストレスに対する耐性を高めることで病原力に関与することも見出している。これらの知見は、本病原細菌の病原力機構、ならびにそれに関する遺伝子発現制御機構の全貌解明に大いに寄与するものである。

## Chapter 1: General introduction (序論)

白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) は、イネの重要病害である白葉枯病の原因細菌である。本病害に対して卓効を示す防除剤は未だ開発されておらず、抵抗性品種の育成と栽培が主たる防除手段となっている。しかしながら、抵抗性品種の育成には莫大な時間と労力が必要とされる上、新たな病原性レースの出現による抵抗性品種の罹病化が問題になっており、必ずしもこれが成功しているとは言えない。それゆえ、新規の防除資材・技術が望まれており、そのためには白葉枯病菌の病原力機構の解明は必須である。

白葉枯病菌は、宿主植物であるイネに侵入し、導管で増殖することで、葉枯れや萎凋といった深刻な病害を引き起こす。本細菌を含む多くのグラム陰性細菌は、タイプIII分泌装置 (T3SS) と呼ばれる繊毛状の装置を介して、エフェクターと呼ばれるタンパク質を直接植物細胞内に送り込むことで、植物の防御機構を抑制・攪乱し、感染を成立させる。T3SS の構成成分は、感染時特異的に発現する *hrp* と呼ばれる一連の遺伝子群によってコードされる。本遺伝子群の発現は HrpG、およびそれによって発

現を制御され、さらに他の *hrp* 遺伝子を直接制御する HrpX と呼ばれる 2 つの因子によって制御されることが報告されている。しかし、それら以外の因子の介在も報告されてきており、その制御機構の全貌は未だ明かではない。

一方、植物体に侵入した白葉枯病菌は、イネ葉導管内で爆発的に増殖し、それに伴い、細菌細胞の物理的保護と同時にイネ導管を閉塞させる菌体外多糖 (EPS) や、植物の細胞壁等の分解に関わる菌体外酵素を産生し、特徴的な病徴を宿主に生じさせる。この時に生じる様々なストレスに対する耐性もまた、重要な病原因子であることが報告されてきている。

本章では、白葉枯病菌の病原力に関わる遺伝子とその発現制御機構について、既知の知見をもとに概説するとともに、感染段階や環境刺激によって複雑に制御された遺伝子発現制御ネットワークについて考察している。

## **Chapter 2:** An H-NS-like protein involved in the negative regulation of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (イネ白葉枯病菌において *hrp* 遺伝子群の負の制御に関与する H-NS 様タンパク質)

白葉枯病菌において、*hrp* 遺伝子群の発現には、二成分制御系のレスポンスレギュレーターである HrpG のリン酸化による活性化と、それに伴うもう 1 つの *hrp* 制御因子 HrpX の発現誘導が必須であることが知られていた。また、これら以外にも *hrpG* の転写を制御する因子が複数報告されている。本章では、H-NS 様タンパク質 XrvB が *hrpG* の転写抑制に関与していることを明らかにしている。H-NS タンパク質は、グラム陰性細菌に広く保存され、種々の環境刺激に応じて、主に遺伝子のプロモーター領域に結合し、RNA ポリメラーゼの結合を阻害することでその遺伝子の転写を抑制する。

イネ白葉枯病菌野生株 MAFF311018 のゲノム中には、3 つの H-NS 様遺伝子がある。そのうちの 1 つである *xrvB* を欠損させた変異株では、*hrpG* の発現、ならびに *hrpX* および HrpX に制御される他の *hrp* 遺伝子の発現が増加していた。また、T3SS を介して植物細胞内に分泌されるエフェクタータンパク質の分泌量の増加も確認された。本結果から、XrvB は *hrpG* の発現を負に制御することにより、*hrp* 遺伝子群の発現と T3SS を介したエフェクターの分泌を抑制するはたらきをもつことが明らかとなった。一方、ゲルシフトアッセイの結果、XrvB の *hrpG* プロモーター領域への結合は認められなかったことから、本制御因子による *hrpG* の転写抑制には、未知因子の介在が考えられた。

## **Chapter 3:** The quantitative regulation of the *hrp* regulator HrpX is involved in sugar-source-dependent *hrp* gene expression in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*hrp* 制御因子 HrpX の量的制御がイネ白葉枯病菌における糖源依存的な *hrp* 遺伝子発現に関与する)

*hrp* 遺伝子群の発現制御系の解析には、本来感染特異的な *hrp* 遺伝子群の発現を *in vitro* で可能にする *hrp* 誘導培地が用いられる。本培地を用いた研究により、白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現

はキシロース存在下で誘導されることが報告されていた。本章では、キシロース存在下における HrpX の特異的な蓄積増加が、*hrp* 遺伝子群の発現誘導を引き起こすことを明らかにしている。白葉枯病菌をキシロース存在下で培養したところ、キシロース非存在下で培養した時と比較して、*hrp* 遺伝子群の発現は著しく増加していたにもかかわらず、それを制御する HrpX および *hrpX* の発現を制御する HrpG の発現に顕著な増加は認められなかった。一方、ウェスタンブロット法により両条件下での HrpX の蓄積を調べたところ、キシロース非存在下でその蓄積量が著しく減少していた。また、他の糖の有無にかかわらず、キシロースの添加により、HrpX の蓄積増加と *hrp* 遺伝子群の発現増加が確認された。これらの結果により、白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現制御の 1 つとして、HrpX の量的制御という新たな機構の存在が見出されたとともに、HrpX の分解と考えられるこの量的制御の抑制因子としてキシロースが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

**Chapter 4: Concomitant regulation by a LacI-type transcriptional repressor XylIR on genes involved in xylan and xylose metabolism and the type III secretion system in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*** (イネ白葉枯病菌におけるキシラン/キシロース代謝とタイプ III 分泌システムの構築に関与する遺伝子群の LacI 型転写抑制因子 XylIR による同時制御)

本章では、前章で述べたキシロース依存的な HrpX の量的制御に、キシラン/キシロース代謝関連遺伝子群の制御因子である LacI 型転写制御因子 XylIR が関与していることを明らかにしている。XylIR 欠損変異株では、HrpX の蓄積と *hrp* 遺伝子の発現が、キシロース存在下と非存在下で同程度になった。一方、XylIR は異種細菌でキシラン/キシロース代謝関連遺伝子群の転写抑制因子として機能することが知られている。本研究では、白葉枯病菌における XylIR もそれらの遺伝子の upstream に存在するモチーフ配列に特異的に結合することでその転写を抑制し、また、その抑制はキシロース存在下で解除されることを明らかにした。以上の結果から、キシロース存在下では、XylIR の不活化によりキシラン/キシロースの代謝が促されると同時に、HrpX の蓄積を引き起こし、それが *hrp* 遺伝子発現の上昇につながるということがわかった。このことは、キシロースが栄養源としてだけでなく、*hrp* 誘導因子としても機能する、本細菌にとって重要な糖であることを示唆している。一方、転写制御因子である XylIR が直接 HrpX の蓄積を制御していることは考えにくく、本制御系には未知因子が介在していることも示唆された。

**Chapter 5: StoS, a hybrid histidine kinase sensor of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, is activated by sensing low O<sub>2</sub> concentration and is involved in stress tolerance and virulence** (イネ白葉枯病菌のハイブリッド型ヒスチジンキナーゼ StoS は低酸素濃度を感知してストレス耐性と病原力に関与する)

細菌において二成分制御系因子は、様々な環境刺激を感知し、それに応じた遺伝子発現や細胞

応答を行う上で重要な因子である。本章では、環境刺激を感知するセンサーヒスチジンキナーゼ (HK) とそのシグナルを下流の遺伝子発現等に伝達するレシーバドメインを併せもつハイブリッド型 HK であるイネ白葉枯病菌の StoS が、低酸素条件下で活性化し、高浸透圧、高塩濃度、および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対するストレス耐性、さらには病原力に関与することを見出している。StoS 変異株は、野生株と比較し、上記のストレス条件下での生存率が低下するとともに、培地中での増殖遅延と、定常期以降の生存率の急激な低下も見られた。さらに、低酸素条件下で、ストレス応答に関わる遺伝子の発現誘導に関与することが明らかとなった。イネ葉導管内で爆発的に増殖する白葉枯病菌は、そこで低酸素条件に遭遇するとともに、イネの防御応答をはじめとする様々なストレスに曝されると考えられる。上記の結果から、低酸素環境を感知する StoS は、それらのストレスに対応する種々の遺伝子発現を行うことで、白葉枯病菌のイネ葉導管内での生存と増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。

## Chapter 6: General discussion (総括)

これまでに、白葉枯病菌の病原力に関わる多数の遺伝子が同定されてきている。また、それらの発現は、時空間的に巧みに制御されるとともに、それぞれの病原力遺伝子の発現制御が相互に関連しあう複雑な制御ネットワークが存在することが明らかになりつつある。宿主防御応答の抑制・攪乱に関わる *hrp* 遺伝子群の発現は、感染極初期にきわめて重要であると考えられる。本研究では、*hrp* 遺伝子の制御因子 *hrpG* の転写を負に制御する新規因子として XrvB を見出すとともに、これまでに知られていなかった、*hrp* 制御因子 HrpX の量的制御が存在すること、そして、それがキシラン/キシロース代謝関連遺伝子群と同一の制御因子 XylR により、同時に制御されることを明らかにした。イネ葉導管内はきわめて栄養の乏しい環境にあると考えられるが、イネ細胞壁にはキシランが多く含まれていることが報告されている。そのような環境条件において白葉枯病菌は、XylR の制御により、キシラン/キシロースを栄養とする初期増殖と、*hrp* 遺伝子の発現を介した宿主防御応答の抑制・攪乱を、同時にかつ効率的に行っていることが予想される。

一方、イネ葉導管内での細菌自身の爆発的な増殖は、低酸素状態と同時に宿主防御応答の結果生じる酸化ストレス等、細菌にとって様々なストレスを引き起こすと考えられる。低酸素濃度を感知して活性化し、ストレス耐性に関わる遺伝子の発現を制御する StoS は、このような環境の生じる感染中後期で特に重要と考えられる。

以上のように、本研究の成果は、白葉枯病菌の病原力関連遺伝子群の発現ネットワークの全体像解明に向けて重要な知見をもたらすものである。この全体像の解明が、現在有効な防除手段のないイネの重要細菌病である白葉枯病の新規防除技術の開発につながると考えている。