

## 青枯病菌の宿主域を決定する因子をゲノムの比較により解き明かす

●大西 浩平<sup>1)</sup> ◆曳地 康史<sup>2)</sup> ◆木場 章範<sup>2)</sup>

1) 高知大学総合研究センター 2) 高知大学自然科学系農学部門

### <研究の目的と進め方>

植物病原細菌は、タンパク質性の病原因子エフェクターを分泌することで宿主植物への感染を成立させる。宿主はエフェクターを認識し、防御応答反応によって抵抗性を発揮する。病原細菌は、さらに新しいエフェクターを分泌し、宿主の抵抗性を回避しようとする。植物病原細菌と宿主植物の関係はこうした相互作用の繰り返しによって成立していると考えられている。その結果、病原菌の宿主域は限られたものとなる。ところが、ナス科植物を初め200種類以上の宿主に感染する青枯病菌は例外的に広い宿主域を持っている。これに対応するように、他の植物病原細菌に比べて、より多種類のエフェクターを持っていることがわかっている。

青枯病菌は、その多様性から複合種と見なされており、MLST解析などから4つのphylogroupに分類される。それぞれのphylogroupは基本的に地政学的に隔離されている。青枯病菌のゲノム解析は、これまでにphylogroup Iに属する1株(GMI1000)で全ゲノム配列が決定され、phylogroup IIに属する1株(UW551)でドラフト解析が行われているにすぎない。両者は系統的に異なるため遺伝子配置で71%のシンテニーしか示さない。ゲノムの比較によって宿主域の決定因子を特定するためには、より系統的に近縁な同一のphylogroupに属する菌株のゲノム情報が必要である。

日本を含むアジアに分布している青枯病菌の大部分は全ゲノム配列の解読されたGMI1000株と同じphylogroup Iに属している。同じphylogroup Iに属している株間でも、その宿主域は異なっている。GMI1000はタバコを宿主としたときに過敏反応(HR)を誘発し病原性を示さないのに対し、OE1-1株は病原性を示すのがその一例である。

本研究の目的は、同じphylogroup Iに属しながら異なる宿主域を持つ青枯病菌株のゲノム配列を比較することで、宿主域の決定機構を解明することである。タバコにHRを誘発する株としてGMI1000株(仏領ギニアでトマトから分離)及び国内分離株8107(トマトから分離)、病原性を示す株としてOE1-1(ナスから分離)を選び、それらのゲノム配列、特にエフェクター遺伝子の配列と構成について比較することで、それぞれの株が現在のどのような宿主域を獲得してきた過程を考察することが可能となる。

### <2008年度の研究の当初計画>

1. OE1-1及び8107ゲノムのドラフト解析：これまでに平均40kbのインサートを持つOE1-1のフォスミドライブラリーを構築し、約400クローンを整理させている。これと高速DNAシーケンスの組み合わせで、GMI1000ゲノムをレファレンスとしてOE1-1ゲノムのほぼ全長のドラフト配列の解読を行う。フォスミドクローンの配列解析の結果から、GMI1000とOE1-1は同じ

phylogroup Iに属しているが、分離された地域が南米と日本で異なることから、遺伝子配置の違いがあることが予想されている。従って、できれば日本国内分離株の完全長もしくはそれに近いドラフト配列を獲得する。この結果をもとに、OE1-1の配列をレファレンスとしてタバコにHRを誘発する国内分離株8107のゲノムのドラフト配列の解読を行う。

2. GMI1000と8107及びOE1-1のエフェクター遺伝子の比較：エフェクター遺伝子についての比較を行う。GMI1000ゲノムから抽出したエフェクター遺伝子80個とOE1-1及び8107の対応する遺伝子との比較によって、宿主域の決定に関与すると思われる候補遺伝子を絞り込む。
3. エフェクター遺伝子以外のゲノム比較：青枯病菌の宿主域の決定に関与している可能性のある、エフェクター以外の病原性関連候補遺伝子をゲノム配列の比較で抽出する。
4. ゲノム比較に基づく変異株の作製：計画2でタバコに対する病原性を決定すると予測された青枯病菌のエフェクターをコードする遺伝子をOE1-1と8107の間に入れ替えた変異株を作製する。OE1-1型から8107型へ、もしくは8107型からOE1-1型へ変換したエフェクタータンパク質を作るように、染色体に変異を導入した変異株をタバコに接種しHRもしくは病原性を検定する。1種類のエフェクター変異だけでは効果が見られない場合は、変異エフェクターを複数組み合わせ、その宿主域を検定する。

### <2008年度の成果>

1. タバコに病気を起こして枯らせてしまうOE1-1株とタバコにHRを誘発する株として8266のドラフトゲノム解析を行った。当初予定した8107株ではなく、8266を用いた。この株は8107と同様にタバコにHRを誘発するのに加え、ミヤコグサに対しても病原性を示すことが知られている。そのため、タバコとミヤコグサの両方の宿主域の決定機構が解明できると期待した。いずれのドラフト解析においてもコンティグ数が1000以上ある状況である。各コンティグについてレファレンス株であるGMI1000に対してBLAST解析を行い、遺伝子配置について調べた。当然ながらほぼゲノム全体にわたりシンテニーが確認できた。GMI1000株は3.7Mbの染色体と2.1Mbのメガプラスミドの2つのレプリコンを持っていることが知られているが、今回ドラフトゲノム解析を行ったOE1-1株、8266株ともに同様にレプリコンは2つであった。シンテニーを示さない領域はメガプラスミドにより多く見られた。2種類の日本分離株間どうしのシンテニー領域は、GMI1000とOE1-1、GMI1000と8266間におけるシンテニー領域よりも広いことが明らかとなった。すなわち、同じphylogroup IIに属するにもかかわらず、南米で分離されたGMI1000株と日本株の間ではdiversityがより高いことが示

された。同様のことは、挿入配列についても見いだされた。GMI1000株には16種類のIS配列が確認されている。OE1-1株は解析途中であるが、8266に関してはGMI1000よりもISの挿入部位が少ないことが明らかとなった。これらのことから日本分離株のレファレンス株の完全長配列の必要性が再確認された。現在、フォスミドクローンの末端配列解析を行うクローン数を大幅に増やして、完全長の配列解析を進めている。

2. GMI1000で80個あると予想されているエフェクター遺伝子について、ドラフト解析を元にOE1-1、8266の両方から抽出を行った。その結果17個のエフェクター遺伝子において、3株間で何らかの違いがみられた。GMI1000株のRSc0824、RSc0895、RSc1723、RSc3212、RSp0213、RSp0572、RSp1212、RSp0213は2種類の日本株のいずれにおいても遺伝子が確認できなかった。こうしたエフェクターは、病原細菌の分離された地理的な状況を反映している可能性がある。OE1-1と8266の間で違いが見られたエフェクター遺伝子はRSc0321、RSc0826、RSc0868、RSc31274、RSc3290、RSp0028、RSp0914、RSp1384、RSp1388があげられる。これらのエフェクター遺伝子がタバコに対する病原性を支配している可能性がある。
4. 2で抽出された候補遺伝子のうち、2つの遺伝子RSp0028、RSp0914はLRR-GALA family type III effector proteinに分類される。青枯病菌において7種類のLRR-GALA family type III effector proteinが知られており、すべてを欠損させた変異株は宿主植物に対する病原性が弱まることが報告されている。そこでまず、これらの7種類のLRR-GALA family type III effector protein遺伝子についてOE1-1と8266の間での入れ替え実験を行うこととした。そのために、OE1-1株において、それぞれの遺伝子の欠失変異株を作製し、そこにOE1-1もしくは8266の対応する遺伝子を染色体上の特定の位置に挿入した株を作製し、タバコに対する病原性を調べるといった手法をとる。現在はそれぞれの遺伝子の欠失変異を作製している段階である。

#### <国内外での成果の位置づけ>

GMI1000株の完全長配列解析を行ったフランスのINRAグループが今年になって phylotype II に属する2株のドラフト解析結果をweb上で公開している。青枯病菌のゲノム解析は従来、完全長1株、ドラフト解析1株について行われてきたが、新たに2株が加えられた。しかしながら同じ phylotype 内での解析は行われておらず、また本来 phylotype I が属する日本を含むアジア分離株の解析はいまだ行われていない状況である。早急に青枯病菌日本株のゲノム解析を行う必要がある。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ドラフトゲノム配列解析において、コンティグ数が1000以上と多い。ひとつの要因はレファレンスに用いた南米分離株GMI1000と日本株の間では、予想以上に遺伝子の配置が異なっているためであると考えられる。そのため、レファレンス株との比較による配列解析に多くの時間を費やさなければならなかった。OE1-1に関しては、いまだ解析が終わっていない状況である。エフェクター遺伝子の抽出は終わることができたが、それ以外の病原性関連遺伝子の比較は全く行うことが出来なかった。また、エフェクター遺伝子の入れ替え実験については、遺伝子欠損株の作出に予想外に時間がかかってしまっている。青枯病菌の遺伝子

欠損株の作出については、これまでに数多く行っており、方法も確立しているが、エフェクター遺伝子については、欠損株作製時に何らかの工夫が必要かもしれない。

#### <今後の課題>

7種類のLRR-GALA family type III effector protein 遺伝子欠損株について、早急に作出を終え、まずそれらのタバコに対する病原性を確認する。その後、OE1-1と8266間での遺伝子入れ替え株を作出し、同様にタバコへの病原性を調べる。

日本株、OE1-1の完全長ゲノム解析を行うことがどうしても必要である。そのためにフォスミドクローンの末端配列解析を進めていく必要がある。

#### <成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0901161426

Yoshimochi,T.,Hikichi,Y.,Kiba,A.andOhnishi,K.:Y The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* hrp regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signalling proteins,J Bacteriol,in press (2009) .

2) データベース/ソフトウェア

なし