

# 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株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(図1)。

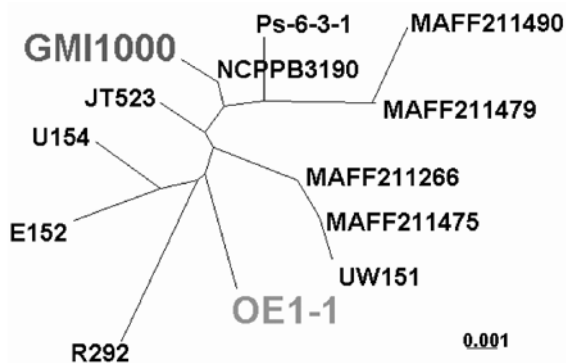


図1 phylogroup Iに属する青枯病菌

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。

## <研究開始時の研究計画>

1. OE1-1株及び8107株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株のフォスミドライブラリーを構築し、約400クローンを整列させている。これと高速DNAシーケンスの組み合わせで、GMI1000株ゲノムをレファレンスとしてOE1-1株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株とOE1-1株は同じ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、遺伝子配置に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株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株のゲノムのドラフト配列の解読を行う。

2. GMI1000株と8107株及びOE1-1株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株ゲノムから抽出したエフェクター遺伝子80個とOE1-1株及び8107株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株と8107株の間で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。

## <研究期間の成果>

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株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株を用いた。この株は8107株と同様にタバコに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以上ある状況であった。各コンティグについてレファレンス株であるGMI1000株に対して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株ともに同様にレブ

リコンは2つであった(図2)。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 phylotype I 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17種類のIS配列が確認されている(図3)。OE1-1株、8266株に関してはGMI1000株よりも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。そこで、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1000クローンに増やして、コンティグ間のギャップを埋めていく作業を行った結果、総コンティグ数は約4分の3に減少した。完全長の配列解析のために、PCRを用いてギャップを埋める作業を行っている。

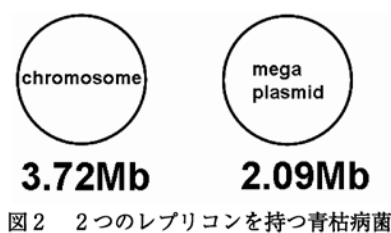


図2 2つのレプリコンを持つ青枯病菌



図3 GMI1000株に存在するIS配列

2. GMI1000株で74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株、8266株の両方から抽出を行った。その結果14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(表1)。GMI1000株のRSc0824、RSc0895、RSc3212、RSp0213、RSp0572、RSp1212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。また、RSc0608は、GMI1000株と日本株の間で大きく異なっていた。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株と8266株の間で違いが見られたエフェクター遺伝子はRSc0257、RSc0826、RSc1356、RSc3174、RSc3290、RSp0914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。また、日本株にのみ見られるエフェクター遺伝子がひとつ存在した。

3. 2で抽出された候補遺伝子のうち、2つの遺伝子RSp0914、RSc1356はLRR-GALA family type III effector protein(図4)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株と8266株の間

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株もしくは8266株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う手法をとる(図5)。まず、それぞれの遺伝子の欠失変異株を作製し、その病原性を調べた(図6)。

表1 比較ゲノムの結果抽出されたエフェクター遺伝子

Gene in GMI1000	Name or family	Features <sup>a</sup>	OE1-1	8266
			Identities to GMI1000 (%)	
RSp0914	GALA1	Leucine Rich Repeats - F box proteins	99 (655/660)	93 (504/540)
			97 (604/620)	truncated 88 (306/346)
RSc1356	GALA6			78 (166/211)
RSc0826	SKWP7	S/T acetyltransferase domain	98(602 aa)	95 (350/368)
			none	none
RSc3212	RipT (YopT family)	Cysteine protease domain	none	none
RSc3290	HopH1 family		100 (217/217)	82 (180/218)
RSp0572	HopH1 family		none	none
RSc0608	AvrA		58 (143/240)	58 (143/240)
RSc0257		Ankyrin repeats	99 (908/912)	none
RSc0824			none	none
RSc0895			none	none
RSc3174			99 (310/311)	none
RSp0213			none	none
RSp1212			none	none

<sup>a</sup>NLS, nuclear localization signals; S/T, serine/threonine.

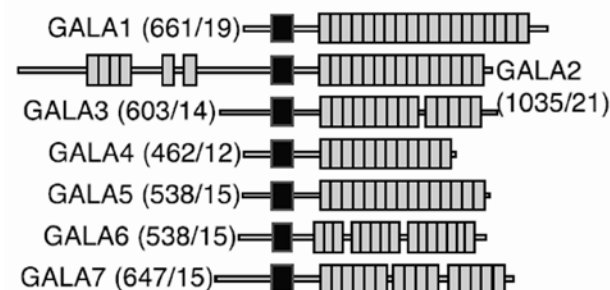


図4 LRR-GALA ファミリー遺伝子の構造 黒いボックスはF-box、灰色はロイシンリッチリピートを示す。括弧内の数字はアミノ酸数/リピート数を表す。

GMI1000株で見られたように、ほとんどすべての1 gala 遺伝子欠損株は野生株OE1-1株と同等の病原性を示したが、興味深いことに、gala4 gala5 遺伝子欠損株は野生株に比べて有意に低い病原性しか示さなかった。この現象が gala4 変異株もしくは gala5 変異株で再現されるかどうか確かめる必要がある。また、いずれ

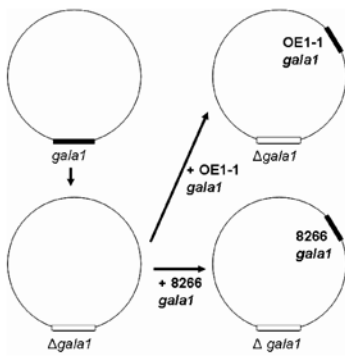


図5 エフェクター遺伝子入れ替え実験の概要

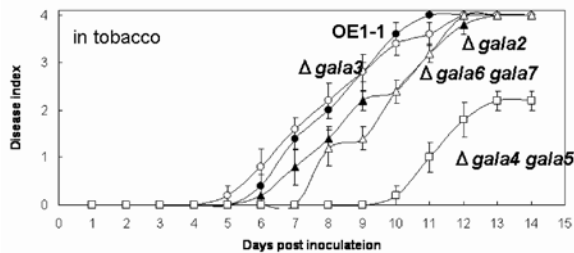


図6 LRR-GALR ファミリー遺伝子欠損株の病原性検定

か1種類の gala 遺伝子だけが発現する変異株およびすべての gala 遺伝子欠損株を構築し、それら変異株の病原性について明らかにする。

4. *gala3* 欠損株はタバコに対して野生株と同等の病原性を示す。エフェクターの入れ替え実験として、この欠損株に 8266 株の *gala3* 遺伝子を図5の手法を用いて導入した。タバコ葉に接種したところ、OE1-1 野生株と同様に病原性を示し、HR は示さなかった。*gala3* 遺伝子は、OE1-1 株と 8266 株の間でよく保存されていることからタバコに対する HR 要因とはならないとの予想とよく一致している。

#### <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 2009 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 株に関しては、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、展望>

本研究によって、同じ青枯病菌 phylotype I に属し全体として

みれば相同性の高い GMI1000 株と日本株は、IS の数や部分的なシクエンスの違いなど細部をみるとかなり異なっていることが明らかとなった。そのため GMI1000 株をレファレンス株として phylotype I 日本株のドラフトゲノム解析を行うことは適切でないと結論付けられる。今後、宿主域の異なる日本株のドラフトゲノム配列解析を進めていく上で新たなレファレンス株が必要である。我々が主な研究対象とし、今回ドラフトゲノム解析を行った OE1-1 株はその候補である。できるだけ早い時期に OE1-1 の全ゲノム配列解析を終了することを第一の目的とする。

宿主の LRR と同じ構造を持つ LRR-GALA family type III effector protein に更に着目し、種々の *gala* 欠損株を構築しタバコに対する病原性を調べる。GMI1000 株では 1 *gala* 遺伝子欠損株及びすべての *gala* 欠損株の病原性しか調べられていない。OE1-1 株において、1 *gala* 遺伝子だけが存在する株などを構築し、GALA の病原性における機能について詳しく調べる。

OE1-1 株と 8266 株の間で違いが見られたエフェクター遺伝子 RSc0257、RSc0826、RSc1356、RSc3174、RSc3290、RSp0914 の OE1-1 株欠損株ならびに 8266 株の対応する遺伝子発現株を構築し、タバコへの HR 能を持つかどうかについて調べていく。これらの研究を進展させることで、青枯病菌日本株がタバコに HR を引き起こすのに必要なエフェクターの同定が可能となる。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文

1. 0912041036  
Liu, Y., Kanda, A., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y., Aino, M., Kawaguchi, A., Mizoguchi, S., Nakaho, K., Shiomi, H., Takikawa, Y., Ohnishi, K.: Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco, *J. Gen. Plant Pathol.*, 75(5), 369-380 (2009).
  2. 0912041029  
Liu, Y., Kanda, A., Kiba, A., Hikichi, H., Ohnishi, K.: Distribution of avirulence genes *avrA* and *popP1* in 22 Japanese phylotype I strains of *Ralstonia solanacearum*, *J. Gen. Plant Pathol.*, 75(5), 362-368 (2009).
  3. 0903101740  
Yoshimochi, T., Zhang, Y., Hikichi, Y., Kiba, A., and Ohnishi, K.: Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*, *J. Gen. Plant Pathol.*, 75, 196-204 (2009).
  4. 0901161426  
Yoshimochi, T., Hikichi, Y., Kiba, A., Ohnishi, K.: The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* hrp regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signalling proteins, *J. Bacteriol.*, 191(10), 3424-3428 (2009).
  5. 0912041051  
Kanda, A., Adachi, M., Ohnishi, K., Kiba, A., Hikichi, Y.: Implication of C-terminal mutation of PopA of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1 in development of bacterial wilt, *Plant Pathol.*, 58, 159-169 (2009).
- ##### 2) 学会発表
1.  
Ohnishi, K., Yoshimochi, T., Zhang, Y., Kiba, A., Hikichi Y.: Expression of *hrpG* and activation of response regulator HrpG are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia*

- solanacearum*, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009.7.20, Quebec City, Canada
2. Zhang, Y., Yoshimochi, T., Kiba, A., Hikichi Y., Ohnishi, K.: A new positive regulator PrhG for the *hrp* regulon in *Ralstonia solanacearum*, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009.7.20, Quebec City, Canada
  3. Kiba, A., Maimbo, M., Ohnishi, K., Yoshioka, H., Hikichi, Y.: E Induction of S glycoprotein-like protein and its participation in defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*, XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009.7.20, Quebec City, Canada
  4. 甲斐建次、小柴慶子、木場章範、大西浩平、曳地康史、林英雄：青枯病菌におけるタイプ III 分泌機構を制御する化学因子の検出，日本農芸化学会 2009 年度大会，2009 年 3 月 28 日，福岡県福岡市
  5. Zhang, Y., Kiba A., Hikichi, Y., Ohnishi, K.: Involvement of newly identified genes *rsc2169*, *rsc2170*, and *rsc2171* in *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulation, 平成 21 年度日本植物病理学会大会，2009 年 3 月 26 日，山形県山形市
  6. 中野真人、大西浩平、曳地康史、木場章範：*Ralstonia solanacearum*-*Nicotiana* 属植物相互作用における Phosphatidic Acid Pase 2 の関与，平成 21 年度日本植物病理学会大会，2009 年 3 月 26 日，山形県山形市
  7. 伊藤慎、大西浩平、曳地康史、木場章範：SGT1 は *Nicotiana benthamiana* の青枯病菌に対する防御応答を負に制御する，平成 21 年度日本植物病理学会大会，2009 年 3 月 26 日，山形県山形市
  8. 張勇、木場章範、曳地康史、大西浩平：A new *hrp* regulon positive regulator HrpG in *Ralstonia solanacearum*, 第 82 回日本細菌学会総会，2009 年 3 月 12 日，名古屋市
  9. 田中将之、大西浩平、木場章範、曳地康史：*Pseudomonas cichorii* の病原性分化に対する Pathogenicity island1 の関与，第 82 回日本細菌学会総会，2009 年 3 月 12 日，名古屋市
  10. Zhang, Y., Kiba A., Hikichi, Y., Ohnishi, K.: Identification of new *Ralstonia solanacearum* genes that affect the *hrp* regulon expression, 平成 20 年度日本植物病理学会関西支部会，2008 年 9 月 18 日，和歌山県和歌山市
- 3) 図書  
なし
  - 4) データベース／ソフトウェア  
なし
  - 5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況  
なし
  - 6) 新聞発表、その他顕著なもの  
なし