



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ソ菜類軟腐病菌・*Erwinia carotovora* subsp.  
*carotovora*におけるペクチナーゼ生産・分泌制御機  
構の分子生物学的解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松本, 裕之 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2627">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2627</a>

氏名(本国籍)	松本裕之(栃木県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第286号
学位授与年月日	平成15年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	ソ菜類軟腐病菌・ <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> におけるペクチナーゼ生産・分泌制御 機構の分子生物学的解析
審査委員会	主査 静岡大学 教授 露無慎二 副査 静岡大学 助教授 瀧川雄一 副査 岐阜大学 教授 百町満朗 副査 信州大学 教授 大政正武

## 論文の内容の要旨

*Erwinia chrysanthemi* (Ech) における KdgR、CRP、Pir、及び PecS タンパク質は、軟腐性 *Erwinia* 属細菌の主要病原因子・ペクチン酸リアーゼ (Pel) の重要な生産制御機構を司ることが報告されている。本論文では、同様に数多くの植物に軟腐病を引き起こす *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) において、これら生産制御因子ホモログの存在及びそれらによる Pel 及びポリガラクトツロナーゼ (Peh) の生産制御の可能性について調べている。これら Ech の生産制御遺伝子をプローブとして Ecc の DNA をサザン解析から、*kdgR* 及び *crp* と相同性領域領域が存在するが、*pir* 及び *pecS* と相同性を示す領域が存在しないことを観察している。そこで、Ecc の *kdgR* 及び *crp* ホモログ遺伝子をそのゲノミックライブラリーよりクローニングしてシーケンス解析を行い、Ech のそれらタンパク質とアミノ酸レベルで高い相同性を示し、推定ヘリックス-ターン-ヘリックス DNA 結合モチーフ配列においてはアミノ酸配列が両者で完全に一致することを見い出している。一方、抗 Pir (Ech) 抗体を用いたウェスタン解析では、他の *Erwinia* 属細菌においても本抗体と作用する抗原の存在を見い出している。しかし、Ech EC16 株で Pir による Pel 生産の超誘導が引き起こる条件下でも、Ecc では、Pel 生産の超誘導は見られないことを観察している。さらに、これら Ech の生産制御遺伝子 (*kdgR*、*crp*、*pir*、及び *pecS*) を含むプラスミドを Ecc に導入して解析を行っている。その結果、Pel 生産は、*pecS* 遺伝子を導入した場合を除き、Ech におけるそれら産物の機能から推測される通りに制御されることを発見している。また、PecS タンパク質は Ech においては Pel 生産を負に制御するが、Ecc においては正

に制御することを発見している。DNA 結合試験からは、実際に Ech の KdgR、CRP、Pir、及び PecS タンパク質が、また Ecc の KdgR 及び CRP ホモログタンパク質が、供試した Ecc の *pel-1*、*pel-3*、及び *peh* 遺伝子プロモーター領域に結合することを確認している。これらの結果から、Ecc における KdgR 及び CRP ホモログタンパク質は、Ech における働きと同様に Pel 及び Peh の生産制御に関与する可能性を示唆した。

また、本論文では、トランスポゾン Tn5 を挿入による Ecc の菌体外酵素（ペクチナーゼを含む）分泌欠損変異株（YMU18）を分離し、この変異株がハクサイやジャガイモで激的に病原性が低下することを発見している。YMU18 株は、ヌクレオシドの取り込みや代謝を司る *cytR* リプレッサー遺伝子、と DNA のミスマッチ修復を司る *mutS* 遺伝子（共に大腸菌等で報告のある）と相同性を示す領域に Tn5 が挿入されていることを調べている。従って、YMU18 株にはこれら *cytR* 及び *mutS* ホモログ遺伝子以外の領域にも何らかの変異が導入されていると考えられた。そこで、Ech のゲノミックライブラリーを用いて YMU18 株の分泌を相補し得るクローンの選抜を試みたところ、*cytR* 及び *mutS* ホモログ遺伝子を含まず、既知の分泌関連遺伝子をも含まないクローンが得ている。一方、Ecc における *cytR* ホモログ遺伝子の非極性欠損変異株（ $\sim$ *cytR*）を相同組み換えにより作製し、 $\sim$ *cytR* 変異株においては、その親株と比べ、Peh 生産の激的な減少し、運動性も失われていることを発見している。実際、 $\sim$ *cytR* 変異株の電子顕微鏡下における観察では、鞭毛は全く観察されないことを確認している。さらに、*fliA* ホモログ遺伝子（鞭毛関連遺伝子特異的シグマ因子をコードする）及び *fliC* ホモログ遺伝子（フラジェリタンパク質をコードする）の発現量を調べ、 $\sim$ *cytR* 変異株におけるそれらの発現量は、その親株における発現量と比べ、明らかに減少し、ハクサイやジャガイモにおける病原性も著しく低下していることを発見している。鞭毛関連遺伝子の統括的制御因子をコードする *flhDC*（大腸菌やサルモネラ菌など多くのグラム陰性細菌において報告のある）ホモログ遺伝子に変異が導入された YMU1 株（Ecc *flhC*::Tn5）及び YMU5 株（Ecc *flhD*::Tn5）においても、それら植物における接種試験において激的な病原性の低下が見られた。これらの結果から、鞭毛或いはそれによる運動性が Ecc の病原性において極めて重要であることを明らかにした。また、Ecc において菌体外酵素の分泌を司る新規の遺伝子は特定されなかったものの、CytR ホモログタンパク質が Ecc において Peh の生産及び鞭毛生成を正に制御し、病原性においても重要な役割を担っていることも発見している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、*Erwinia chrysanthemi* (Ech) において、KdgR、CRP、Pir、及び PecS タンパク質は、主要病原因子・ペクチン酸リアーゼ (Pel) の重要な生産制御機構を司ることが報告されていることを受け、世界中で多大な被害をもたらす軟腐病細菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) において、これら生産制御因子ホモログの存在、これらの因子による生産制御機構について詳細に解析して、以下の結果を得ている。1) Ech の *kdgR* 及び *crp* と相同性領域領域の存在を Ecc において発見し、これらの遺伝子をクローニングしてシーケンス解析から、両細菌間でこれらの因子の相同性が高い事、推定ヘリックス-ターン-ヘ

リックス DNA 結合モチーフ配列が完全に一致することを発見している。2) Ecc の上記制御遺伝子 (*kdgR*, *crp*, *pir*, 及び *pecS*) を持つプラスミドを Ecc に導入して解析を行い、Ech におけるそれら産物の機能から推測される通りに制御されることを見い出している。ただ、PecS タンパク質は、Ech においては Pel 生産を負に制御するが、Ecc においては正に制御することを発見している。3) DNA 結合試験から、実際に Ech の KdgR, CRP, Pir, 及び PecS タンパク質が、また Ecc の KdgR 及び CRP が、供試した Ecc の *pel-1*, *pel-3*, 及び *peh* 遺伝子プロモーター領域に結合することを確認している。これらの結果から、Ecc の KdgR 及び CRP は、Ech と同様に Ecc においても Pel 及び Peh の生産制御に関与する可能性を示している。

また、本論文では、Tn5 挿入による Ecc の菌体外酵素 (ペクチナーゼを含む) 分泌欠損変異株を分離し、この変異株がハクサイやジャガイモで激的に病原性が低下することを発見し、本挿入遺伝子が *cytR* リプレッサー遺伝子と DNA の mismatch 修復を司る *mutS* 遺伝子 (共に大腸菌等で報告のある) であることをつきとめている。次に、Ecc において *cytR* 欠損変異株による Peh 生産が激的に減少し、運動性も失われていることを発見している。そこで、*fliA* 遺伝子 (鞭毛関連遺伝子特異的シグマ因子をコード) 及び *fliC* 遺伝子 (フラジェリントンパク質をコード) の発現量を調べ、が明らかに減少していることを確認している。また、*cytR* 変異株は病原性も著しく低下していたが、鞭毛関連遺伝子の統括的制御因子をコードする *fthDC* (大腸菌やサルモネラ菌など多くのグラム陰性細菌において報告のある) ホモログ遺伝子に変異が導入した場合も、激的な病原性の低下することを発見している。

以上のごとく、本論文は独創性、論理性に優れた論文であり、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

(基礎となる学術論文)

1. Matsumoto, H. Muroi, M. Umehara, Y. Yoshitake, and S. Tsuyumu; Peh Production, Flagellum Synthesis, and Virulence Reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by Mutation in a Homologue of *cytR*. *Mole. Plant-Microbe Interact.* In print. (2003)
2. Matsumoto, H., J. Pongphen, B. Yasuhiro, and S. Tsuyumu; Comparative Study of Regulatory Mechanisms for Pectinase Production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Mole. Plant-Microbe Interact.* In print (2003)
3. Matsumoto, H., M. Uehara, H. Muroi, Y. Yoshitake and S. Tsuyumu, A Homologue of FthDC, a Master Regulator for flagellum Synthesis, Is Required for Pathogenicity in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Gen. Plant Pathol.* In print. (2003)
4. P. JITAREERAT<sup>1,2</sup>, H. MATSUMOTO<sup>1,2</sup>, M. UMEHARA<sup>2</sup> and S. TSUYUMU. D-alanine-D-alanine ligase gene (*ddl*) of *Erwinia chrysanthemi* strain EC16. I. Isolation and Gene dosage effect on pectate lyase synthesis. *J. Gen. Plant Pathol.* In print (2003)
5. P. JITAREERAT<sup>1,2</sup>, H. MATSUMOTO<sup>1,2</sup>, M. UMEHARA<sup>2</sup> and S. TSUYUMU. D-alanine-D-alanine ligase gene (*ddl*) of *Erwinia chrysanthemi* strain EC16. II. Analysis of Pectate Lyase Regulation Using *ddl* Mutant. *J. Gen. Plant Pathol.* In print (2003)