

氏 名（国籍）	井 上 康 宏 （ 静 岡 県 ）
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	農博甲第154号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月15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	<i>Pseudomonas syringae</i> 群細菌の病原性に関与する 遺伝子の研究
審 査 委 員	主査 静岡大学教授 露 無 慎 二 副査 岐阜大学教授 百 町 満 朗 副査 信州大学教授 大 政 正 武 副査 静岡大学助教授 瀧 川 雄 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

P.syringae 群細菌は植物に対する寄生性の違いにより多数の病原型が存在する。これら病原型は寄生性以外でも様々な性状の違いを持ち、いくつかのグループに類別できることが報告されてきた。また、個々の遺伝子の分布や比較による菌株間の類別は試みられているが、多数の遺伝子を含む広い領域や複数の遺伝子領域の分布の比較は行われていなかった。本研究では病原性に関与する遺伝子の相同性や分布によってこの細菌群の類別が可能かどうかを検討した。

hrp 遺伝子及びその周辺領域は病原性に関与する遺伝子が多数存在することからこの領域が *P.syringae* 群細菌の病原性発現に深く関与している。そこで *pv.coronafaciens* (Psc)、*pv.glycinea* (Psg)、*pv.maculicola* (Psm)、*pv.tabaci* (Pst)、*pv.syringae* (Pss) の遺伝子ライブラリーを作成し、既存の *pv.phaseolicola* (Psp) のものと併せて *hrp* 遺伝子群とその周辺領域を含む広い範囲のクローンの選抜し、制限酵素地図及び相同性の比較を行った。その結果、Psg、Psp、Pst はよく一致しており近縁であると考えられたが、その他の菌株では全く異なっていた。すべての菌株において *hrp* 遺伝子の右外側には *avrE* 遺伝子領域が存在することが明らかとなった。Psp、Psm、Pss、Psc のクローンよりプローブを作成し、サザンハイブリダイゼーションによって *P.syringae* 群細菌の類別を試みた結果、Psp 由来のプローブに高い相同性を示す菌群（Ⅰ菌群）、Psm 由来のプローブに高い相同性を示す菌群（Ⅱ菌群）、Pss 由来のプローブに高い相同性を示す菌群（Ⅲ菌群）、Psc 由来のプローブに高い相同性を示す菌群（Ⅳ菌群）、いずれにも属さないもの（Ⅴ菌群）の少なくとも5つのグループに類別された。

上述の調査で *hrpL* 左外側領域の相同性は菌株によって異なることが明らかとなったため、Psm、*pv.actinidiae*(Psa)及び Psp のこの領域の塩基配列を比較した。調査したすべての菌株で *hrpY* 相同領域が存在したが、他の部分は菌株により異なっていた。Psm と Psa には *hrpY* 相同領域に隣接した 70bp の相同領域と非相同性領域を挟んで約 900bp の相同領域 (AM 領域) が認められた。Psm と Psp では約 780bp の相同領域 (MP 領域) が存在した。*hrpY*、AM、MP 及び *avrPphE* 領域にプライマーを設計し、PCR による増幅断片の菌株間の比較を行った結果、前述の類別に矛盾せず *P.syringae* 群細菌をさらに細かく類別できることが明らかとなった。また、PCR 増幅断片の塩基配列の比較の結果、*hrpL* 左外側領域では遺伝子の挿入や組み換えが頻繁に起こっていることが推察された。

他の病原性関連遺伝子として *P.syringae* 群細菌から分離された 8 つの *avr* 遺伝子とシリノマイシン生合成遺伝子の分布を調査した。*avr* 遺伝子は病原型に関係なく多数の菌株に存在し、その分布に規則性は認められなかった。シリノマイシン生合成遺伝子はⅢ群菌の菌株に認められたが、例外的にⅠ群菌のキウイフルーツ花腐病菌からも検出された。よってこれらの遺伝子は類別には利用することはできないが、水平伝搬していることが考えられるため、病原菌の進化を考える上で重要であることが判明した。

氷核活性遺伝子と相同な領域をもつ菌株でも表現形質としては氷核活性を示さない菌株が存在する。そこで氷核活性遺伝子を持ち氷核活性を示す Psta と Pss の菌株、氷核活性遺伝子と相同な領域を持つが氷核活性を示さない Psp の菌株を比較した。Psta、Pss 及び Psp の氷核遺伝子領域を含むクローンを遺伝子ライブラリーより選抜し、Psp 及び氷核活性遺伝子を持たない Psm にこれらクローンを形質転換した結果、Psta、Pss のクローンでは氷核活性を示すようになったが、Psp 由来のクローンでは氷核活性を示さなかった。Psp のこの領域の塩基配列を決定した結果、*Burkholderia cepacia* より分離された IS402 と高い相同性をもつ配列が挿入されており、これによって氷核活性遺伝子が分断され、表現型として氷核活性を示さないものと推測された。本研究は氷核活性遺伝子が IS によって発現制御されていることを調査した最初の報告である。

hrp 遺伝子群の周辺領域には多数の繰り返し配列があることが調査の過程で明らかとなった。Psm の *hrpL* 外側にある繰り返し配列の塩基配列を決定した結果、IS5 と相同性を持つ配列が複数見出され、挿入後に欠損を生じた痕跡が認められた。Psa の *hrpL* 外側にある繰り返し配列の塩基配列を決定した結果、IS1240 と相同な領域が認められた。Psp の NPS3121 株の *avrPphE* 領域内にも挿入後に欠損を生じたと思われる IS の断片が認められた。これらのことから、*hrp* 遺伝子群の周辺領域においては遺伝子の挿入や組み換えが頻繁に起こっていたことが考えられた。

本研究の成果は *P.syringae* 群細菌の類別の再考や IS による表現形質の制御及び遺伝子の再編の考察を行う上で非常に有用な情報であり、また、本研究で作成された遺伝子ライブラリー、選抜されたクローンなどは今後の病原性発現のメカニズムや遺伝子の再編を研究する上での重要な材料となるであろう。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は植物細菌病の主要なグループである *Pseudomonas syringae* 群細菌についてその類別を病原性関連遺伝子の分布や相同性から試み、さらにそれから派生したIS領域の解析や氷核遺伝子の発現調節に関与する遺伝子レベルのメカニズムを解明したものである。

P. syringae 群細菌は植物に対する寄生性の違いにより多数の病原型が存在する。これら病原型は寄生性以外でも様々な性状の違いを持ち、いくつかのグループに類別できることが報告されてきたがその類別は容易ではなかった。本論文では病原性に関与する遺伝子の相同性や分布によってこの細菌群の類別が可能かどうかを検討された。まず、代表的な病原型である *pv. coronafaciens* (Psc)、*pv. glycinea* (Psg)、*pv. maculicola* (Psm)、*pv. tabaci* (Pst)、*pv. syringae* (Pss) の *hrp* 遺伝子群とその周辺領域の制限酵素地図が作成され、比較の結果 Psg、Psp、Pst はよく一致しており近縁であったが、Psm、Pss、Psc では全く異なっていることを見出した。さらに、Psp、Psm、Pss、Psc の本領域のプロープを作成し、サザンハイブリダイゼーションによって *P. syringae* 群細菌の多数の病原型の類別を試みた結果、それぞれの菌由来のプロープに高い相同性を示す4つの菌群 (I, II, III, IV 菌群) といずれにも属さないもの (U 菌群) の少なくとも5つのグループに類別されることを示した。この類別は従来の報告と矛盾せず、さらに多くの病原型の容易な類別を可能にするものであることを示した重要な成果であり、高く評価される。さらに *hrpL* 左外側領域の相同性を詳細に調査し、Psm と *pv. actinidiae* (Psa)、Psm と Psp の間にそれぞれ特異な相同領域が存在し、これら領域のPCRによる菌株間の比較により上記の類別に矛盾せず *P. syringae* 群細菌をさらに細かく類別できることを明らかにした。このことによって、より簡単な分類手段を確立したと言え、応用上の価値も高いと思われる。

hrp 遺伝子以外の病原性関連遺伝子として *P. syringae* 群細菌から分離された8つの *avr* 遺伝子とシリノマイシン生合成遺伝子の分布を調査しているが、いずれも規則性は認められなかった。よってこれらの遺伝子は類別には利用することはできないが、むしろ水平伝搬していることを示唆していると考えられるため、病原菌の進化を考える上で重要であることが判明した。このことは従来にはなかった新知見である。また、氷核活性遺伝子について、相同な領域を持つが氷核活性を示さない Psp のこの領域の塩基配列を決定した結果、IS402 と高い相同性をもつ配列が挿入されており、これによって氷核活性遺伝子が分断され表現型として氷核活性を示さないものと推測された。本研究は氷核活性遺伝子がISによって発現制御されている可能性を示した初めての報告である。さらに Psm の *hrpL* 外側にある繰り返し配列では IS5 と相同性を持つ配列が複数見出され、挿入後に欠損を生じた痕跡が認められた。Psa の *hrpL* 外側にある繰り返し配列では IS1240 と相同な領域が認められた。Psp の 3121 株の *avrPphE* 領域内にも挿入後に欠損を生じたと思われるISの断片が認められた。これらのことから、*hrp* 遺伝子群の周辺領域においてはISが多数存在し、遺伝子の挿入や組み換えが頻繁に起こっていた可能性を明らかにした。

これらの成果は *P. syringae* 群細菌の類別の再考やISによる表現形質の制御及び遺伝子の再編などにより分化した病原型の成立を考える上で非常に有用な情報であり、細菌の類別法

における成果とともに進化研究上も価値ある成果が得られているものと判断された。このように本論文は学術上も応用上も寄与するところが大であり、よって審査員全員一致で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

Inoue, Y. and Takikawa, Y. (1999). *Pseudomonas syringae* strains are grouped by comparison of DNA homology at *hrp* genes cluster and its neighboring regions. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 65 (in press).

Inoue, Y. and Takikawa, Y. (1999). Investigation of repeating sequences on *hrpL* neighboring region of *Pseudomonas syringae* strains. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 65 (in press).