



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Erwinia chrysanthemi

EC16株のペクチン酸リアーゼの生産制御機構の分子
生物学的解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 野村, 欽弥 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2506

氏名（国籍）	野村 欽 弥（愛知県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第165号
学位授与年月日	平成11年9月10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>Erwinia chrysanthemi</i> EC16株のペクチン酸 リアーゼの生産制御機構の分子生物学的解析
審査委員	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 副査 静岡大学教授 兵 藤 宏

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、植物病原細菌 *Erwinia chrysanthemi* EC16 株の生産する主要な病原性因子であるペクチン酸リアーゼの新しい生産制御機構を発見し、これを詳細に解析したものである。

E. chrysanthemi 菌を本酵素の基質と植物粗抽出液を含む培地で培養すると、本酵素生産量が飛躍的に高まる、いわゆる超誘導のメカニズムがある。この機構を明らかにするため、本酵素生産遺伝子(*peIE*) のプロモーター領域に特異的に結合するたんぱく質をゲルシフトアッセイ法を用いて単離精製している。さらに、この純化たんぱく質の N 末端アミノ酸の配列を決定し、この配列をコードする DNA オリゴマーを合成し、これをプローブとすることにより、この結合たんぱく質生産遺伝子 (Plant Inducible Regulator, *pir*) をクローニングしている。得られたクローンから、*pir* 構造遺伝子及びその制御領域の塩基配列を決定し、これらの情報を基に、次のような解析を行っている。

- 1) *pir* 遺伝子のノックアウト変異株を分離し、この変異株では病原性を著しく低下している事を見出した。即ち、本遺伝子が病原発現に必須者である事を明らかにしている。
- 2) また、同ノックアウト株では、植物成分添加によるペクチン酸リアーゼの超誘導が見られなくなる事を確認し、*pir* 遺伝子が本酵素の生産を正に制御する因子である事を立証している。

3) *pir* 遺伝子を大量生産用発現ベクターに接続し、得られた純化たんぱく質のゲルシフトアッセイを行い、Pir がペクチン酸リアーゼ及びその他のペクチン代謝関連酵素の上流領域に結合する事を見出し、*pir* 遺伝子がペクチンの分解、代謝に関連する酵素群の制御を行う事を示唆している。

4) Pir たんぱく質が *pir* 遺伝子上流領域に結合する事を発見し、Pir の自己制御機構を明らかにした。

以上のごとく、本論文は、*E. chrysanthemi* EC16 株における病原性発現の中心となるペクチン酸リアーゼの超誘導機構を見事に解きあかしたものである。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、重要植物病原細菌の一つである *Erwinia chrysanthemic* の発病因子であるペクチン酸リアーゼの植物体内における超誘導機構を明らかにしたものである。本酵素の生産制御機構については、制御因子 KdgR が関与する基質分解産物による誘導、RecS 因子による菌体外酵素の生産全体を制御する機構、ホモセリンラク톤を誘導物質とする。

自己誘導機構、ペクチン質の代謝産物によるカタボライト抑制機構などが報告されている。しかし、本酵素の植物体内における異常生産をこれらの制御機構で説明する事は出来ない。本論文は、ペクチン酸リアーゼの構造遺伝子上流領域に結合するたんぱく質を直接解析するゲルシフトアッセイ法を用いて、上記細菌を植物抽出液含有培地に生育させた時に、その細胞破壊液を加えてシフトが見られなくなるたんぱく質が存在する事を見出した。そこで、種々カラムの溶出液についてゲルシフトアッセイで活性分画を集め、上記たんぱく質を SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで純化した。この N 末端アミノ酸配列から、その一部をコードする混合 DNA オリゴマーをプローブとして、本たんぱく質の構造遺伝子をクローニングすることに成功し、その DNA 塩基配列を決定した。塩基配列の相同性検索から、本たんぱく質が新規たんぱく質であることが明らかとなり、Plant Inducible Regulator, Pir と命名した。次に、発現ベクターを用いて、本たんぱく質を大量生産し、純化たんぱく質を用いたゲルシフトアッセイにより、本たんぱく質がペクチン酸リアーゼばかりでなく、ペクチン代謝関連遺伝子上流領域にも結合する事を明らかにし、本たんぱく質がこれらの酵素の生産を制御する因子であることを予測した。これを確認するため、マーカーエクステンジにより本因子に変異を導入し、レポーター遺伝子を用いて、これらの酵素が植物体内で超誘導されなくなる事を見出ししている。さらに、本因子は自身の上流領域にも結合し、自身の転写を制御している事も見出ししている。これらの発見は、

発病因子の植物体内における超誘導機構を明らかにしたもので、以下の2報に掲載された。

以上のことより、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。

発表論文：

1. K. Nomura, W. Nasser, H. Kawagishi, and S. Tsuyumu (1998) The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. Proc. National Acad. Sci. USA 95:14034 - 14039.

2. K. Nomura, W. Nasser, and S. Tsuyumu (1999) Self-regulation of Pir, a Regulatory Protein Responsible for Hyperinduction of Pectate Lyase in *Erwinia chrysanthemi* EC16. Molecular Plant-Microbe Interactions 12 (5): 385 - 390.