

氏 名（国籍）	金 森 裕 之（静岡県）
学 位 の 種 類	博士（農学）
学 位 記 番 号	農博甲第155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>Xanthomonas</i> 属細菌の病原性遺伝子に関する研究
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

本論文はカンキツかいよう病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *citri* の病原性関連遺伝子である‘かいよう形成因子生産遺伝子である *pth* 相同性遺伝子’と‘病原性と抵抗性誘導の双方を司る *hrp* 遺伝子’について解析を行い、本病原細菌による発病機構の解明に向けて新たな情報を得るとともに、病原性関連遺伝子の進化についても新たな視点から考察をしている。

*pth* 相同性遺伝子については、本遺伝子の特徴である翻訳領域内の15～20個の102 bp からなる繰り返し配列部よりプローブを選抜し、これを用いたサザンブロット解析からカンキツかいよう病菌が3～4個の *pth* 相同性領域を持つことを見い出している。次に、カンキツかいよう病菌 NA-1 株を用いて、これらの領域をカバーするクローンを得て、各々の DNA 塩基配列を決定している。その結果、1) 上記繰り返し配列の数と、その翻訳産物の繰り返し配列部内3、4、5番目と12、13番目の可変アミノ酸に若干の違いが見られる、2) その他の翻訳領域の配列は完全に一致する。3) 翻訳産物の2次構造は3者の間で大きく異なる、4) 翻訳領域の上流247塩基及び111塩基までの配列も完全に一致する、5) 相同領域の両端は逆向きの繰り返し配列となっている事を見い出している。これらの結果は、この *pth* を含む領域全体が動く因子として機能し、細菌内で複数のコピーを保持させ、相同領域間における組み換えによる病原性遺伝子の速やかな変化を可能にしていると推察している。また、これら3領域を、トランスポゾンタグgingによって得たカンキツかいよう病菌の病原性欠損変異株に導入した形質転換体をカンキツ葉に接種し、病原性の回復を調査している。その結果、1) 完全に野生型レベルまで病原性を回復させるもの、2) 2倍の日数を要するが、最終的

には病原性を回復させるもの、3) 全く病原性を回復させることが出来ないものに分かれることを明らかにしている。この結果から、かいよう形成には、pth 相同性遺伝子の繰り返し配列部が重要な役割を担うことを明らかにしたものである。さらに、pth 遺伝子の繰り返し配列の違いが、どのようにたんぱく質の二次構造を変化させるのかについても検討を行い、繰り返し部における規則的な立体構造の形成の重要性について考察している。

一般に、植物病原細菌における hrp 遺伝子群は、宿主植物においては病原性発現、非宿主植物においては抵抗性誘導を司るもので 20～30 kbp の領域にクラスターを形成していることが報告されている。そこで、カンキツかいよう病菌の hrp 遺伝子群のコスミドクローンをプローブとして、各種 Xanthomonas 属細菌の全 DNA のサザンブロット解析を行い、Xanthomonas 属細菌間の類縁関係について調べている。その結果、カンキツかいよう病菌の hrp 遺伝子群と高い相同性を示す領域が Xanthomonas 属細菌に分布していることが確認されている。さらに、RFLP 解析を行い、同種或いは同病原型に属する細菌の間では RFLP パターンが共通するが各病原型の間でこれが異なることを見い出している。従って本プローブを用いた RFLP 解析によって Xanthomonas 属細菌を簡便に識別できることを見い出している。また、RFLP パターンの違いに基づいて作成した系統樹は、リボゾーム RNA 遺伝子等の病原性には関係のない遺伝子を用いて作成した系統樹や培養学的性状の調査に基づいて作成した系統樹とは異なることを見出し、病原性遺伝子の進化について新たな視点から考察している。

最後に、上記 apl 遺伝子翻訳残物内に核局在性配列を持つこと、apl 遺伝子が機能する hrp 遺伝子群を必要とすることに着目し、apl1 遺伝子を持つプラスミドと hrp 遺伝子群を持つコスミドを同時に導入した大腸菌が、カンキツにかいよう症状を呈することができるようになることを発見している。かいよう症状の判定は、接種部における細胞肥大と高頻度細胞分裂を組織学的な観察から行っている。この発見は、本遺伝子が宿主植物内に入りさえすれば、かいよう形成機構を発揮することを明らかにしたものである。今後のかいよう形成機構を解明するために重要な示唆を与えるものとして注目される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、カンキツかいよう病菌 Xanthomonas campestris pv. citri の病原性関連遺伝子である‘かいよう形成因子生産遺伝子である pth 相同性遺伝子’と‘病原性と抵抗性誘導の双方を司る hrp 遺伝子’について解析を行い、本病原細菌による発病機構に新たな情報を得るとともに、病原性関連遺伝子の進化を論じる根拠となる結果を得ている。

pth 相同性遺伝子については、本遺伝子の特徴である ORF 内の 15～20 個の 102 bp からなる繰り返し配列部よりプローブを選抜し、これを用いたサザンブロット解析から、カンキツかいよう病菌が 3～4 個の pth 相同性領域を持

つことを見い出している。次に、カンキツかいよう病菌 NA-1 株を用いて、これらの領域のクローンを得て、各々の DNA 塩基配列を決定している。その結果をまとめると、1) 上記繰り返し配列の数と、その翻訳産物の繰り返し配列部内3、4、5番目と12、13番目の可変アミノ酸に若干の違いが見られた。2) その他の翻訳領域の配列は完全に一致した。3) 翻訳産物の2次構造は3者の間で大きく異なった。4) 翻訳領域の上流247塩基及び111塩基までの配列も完全に一致した。5) 相同領域は逆向きの繰り返し配列となっていた。これらの結果より、この領域全体が動く因子として機能し、複数の相同領域間における組み換えによる病原性遺伝子の速やかな変化が可能であることを示唆している。また、上記3領域を、トランスポゾンタグgingによって得た病原性欠損変異株に導入し、カンキツ葉に接種し、病原性の回復を調査している。その結果、1) 完全に野生型レベルまで病原性を回復させるもの、2) 2倍の日数を要するが、最終的には病原性を回復させるもの、3) 全く病原性を回復させることが出来ないものと分けられた。この結果は、かいよう形成には、*pth* 相同性遺伝子の繰り返し配列部が重要な役割を持つことを明らかにしたものである。

*hrp* 遺伝子群は、宿主植物においては病原性発現を、非宿主植物においては抵抗性誘導を司り、20～30 kbp の領域にクラスターを形成している。カンキツかいよう病菌の *hrp* 遺伝子群のコスミドクローンをプローブとして、各種 *Xanthomonas* 属細菌の全 DNA のサザンブロット解析もなされている。その結果、カンキツかいよう病菌の *hrp* 遺伝子群と高い相同性を示す領域が *Xanthomonas* 属細菌に分布していることが確認されている。さらに、RFLP 解析を行い、同種或いは同病原型に属する細菌の間では RFLP パターンが共通するが、各病原型の間でこれが異なることを見い出している。この違いに基づいて作成した系統樹は、リボゾーム RNA 遺伝子等の病原性には関係のない遺伝子を用いて作成した系統樹と異なることを見い出し、病原性遺伝子の進化について考察している。

最後に、上記 *apl* 遺伝子翻訳産物内に核局在性配列が存在すること、*apl1* 遺伝子が機能する *hrp* 遺伝子群を必要とすることに着目し、本遺伝子と *hrp* 遺伝子群を同時に導入することにより、大腸菌がカンキツにかいよう症状を呈することができるようになることを発見している。この発見は、かいよう形成機構解明に向けて重要な示唆を与えるものと注目される。

以上のごとく、本論文は博士論文として十分な内容を持つものと判断できる。

学位論文の基礎となる学術論文

Kanamori, H. and Tsuyumu, S. (1998). Comparison of Nucleotide Sequences of Canker-forming and Non-canker-forming *pthA* Homologues in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn, 64 (5):462-470 (1998)

Kanamori, H., H. Sugimoto, H. Ochiai, H. Kaku, and S. Tsuyumu (1999) Isolation of *hrp* cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and its application for RFLP analyses of xanthomonads. Ann. Phytopathol. Soc. Japan, 65 (in press).