

*Xanthomonas* 属細菌の病原性遺伝子に関する研究

1998年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物環境科学

(静岡大学)

金森 裕之



目次 (CONTENTS)

はじめに (INTRODUCTION)

参考文献 (REFERENCES)

*Xanthomonas* 属細菌の病原性遺伝子に関する研究

要約 (SUMMARY)

はじめに (INTRODUCTION)

結論 (CONCLUSION)

おわりに (FINAL REMARKS)

謝辞 (ACKNOWLEDGEMENTS)

参考文献 (REFERENCES)

金森裕之

著者について (ABOUT THE AUTHOR)

# 目次(CONTENT)

緒言(INTRODUCTION)	1
材料及び方法(MATERIALS AND METHODS)	3
結果(RESULTS)	8
考察(DISCUSSION)	19
結論(CONCLUSION)	32
摘要(SUMMARY)	33
SUMMARY(TEKIYOU)	35
謝辞(ACKNOWLEDGEMENT)	37
参考文献(REFERENCE)	38



## 緒言(INTRODUCTION)

病原体が宿主植物の中に侵入した時、品種によっては病斑を形成せずに宿主植物が過敏感反応死などの形で抵抗反応を誘導する(60)。この現象は Flor が提唱した遺伝子対遺伝子説によって説明されている(19)。この説に従うと、植物体の有する抵抗性[R(resistance)]遺伝子産物が、病原体が生産する非病原性[avr(avirulence)]遺伝子産物を認識し抵抗反応を誘導するということになる。この時病原体が持つ非病原性遺伝子は、この遺伝子の作用によって宿主の作用を受けるという点で、生きた植物体の中で繁殖する植物病原菌および植物病原細菌にとって不利なものとして存在している。この点において、非病原性遺伝子は、毒素、酵素、植物ホルモンなど病原因子を直接コードしている遺伝子や *Xanthomons* spp., *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp. の *hrp* (Hypersensitive Reaction and Pathogenicity) 遺伝子(30, 45, 49, 57, 76, 80, 84)、*R. solanacearum* の *dsp* (Disease SPecific) 遺伝子(2)、*X. c. pv. translusence* の *hsv* (Host Specific Virulence) 遺伝子(79)とは大きく性質を異にしている。非病原性遺伝子の存在は Flor によって推定され遺伝子対遺伝子説で説明されてきた(19)。遺伝子の存在が実際に示されたのは、1984 年 Staskawicz らによって分離されたダイズ斑点細菌病菌(*P. s. pv. syringae*) の *avrA* が最初である(44, 69)。今では、*Xanthomons* 属や *Pseudomonas* 属といった植物病原細菌での存在も確認されクローニングされたものは 30 を越える(39, 51, 61, 93)。しかしながら、生産されたタンパクにまで言及されているものは *avrD* のみである(37, 42, 43, 93)。非病原性遺伝子の機能的特徴として、遺伝子産物の *hrp* 依存性が挙げられる。Svresh らは核果類かいよう病菌の *avrB* と *hrp* 遺伝子のクローンを *P. fluorescens* や大腸菌に導入し、非宿主植物(シロイヌナズナ)や抵抗性の宿主植物(ダイズ)に接種したところ、何れのケースにおいても抵抗反応を示し、*avr* 遺伝子の作用には *hrp* 遺伝子の作用が必要になることを報告した(24)。*Xanthomonas* 属細菌の *avr*



遺伝子の中には、共通の特徴的な構造を有する遺伝子が幾つか存在することが報告されている。*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* の *avrBs3*, *avrBs3-2*(7, 69), *X. c.* pv. *malvacearum* の *avrb4*, *avrb6*, *avrb7*, *avrBln*, *avrB101*(16, 21, 36, 89, 90), *X. oryzae*, pv. *oryzae* の *avrXa7*, *avrXa10* がその中に含まれる(31)。これらは *avrBs3/pth* family と呼ばれ、構造的特徴として 3~5kb 領域の中央部にそれぞれ 102bp を 1 単位とした 15 から 25 単位の繰返し配列を持っていることが挙げられている。これら *avr* 遺伝子についても Bonas らが *avrBs3* が *hrp* クラスターに形質発現する上で依存していることを報告している(41)。

*hrp* 遺伝子は過敏感反応誘導能と病原性の 2 つを同時に支配する遺伝子として知られている。この遺伝子については、多くの植物病原菌において同様な機能を持つ遺伝子が存在すること(4, 33)、制御に関わるものや *hrpM* は例外として約 25kb の断片上に 20 以上の *hrp* 遺伝子がクラスター(群)を形成していることが報告されている(81, 82, 91)。このクラスターの中には少なくとも 2 つの機能を司る領域があることが報告されている。1 つは動的抵抗性の信号物質であるエリシターを直接生産する領域であり(28)、もう 1 つは細胞外への分泌に関与すると考えられる領域である。分泌に関わるとされる領域は *Ralstonia solanacearum* や *Xanthomonas* 属菌の *hrp* 遺伝子の解析によって初めて指摘されたもので(20, 25, 52, 54, 56)、タイプⅢ分泌機構(62)の構成成分と推定されている(26, 40, 58, 59, 73)。

*X. c.* pv. *citri* はカンキツかいよう病の病原体であるが、この病害は特に抵抗性の弱いスイートオレンジやグレープフルーツに大発生するため、過去にアメリカ、ブラジルなどで大きな経済的被害をもたらした。このため、アメリカやヨーロッパでの国際検疫の最重要病害に指定され、貿易規制の背景となっている(22)。本菌の検疫や防除は国際的な課題であると言える。この菌がカンキツの組織に侵入すると、組織の増生に始まって最終的にはコルク状



のいわゆるかいよう病斑を葉、枝、果実に形成する。その結果、落葉、落果、苗木の枯死などを引き起こすこともある。このかいよう形成に関与する遺伝子として *pthA* が報告されている(71)。この遺伝子も前述の *Xanthomonas* 属の *avr* 遺伝子に特有の繰返し配列を持つことが報告されている。この様に構造が酷似しているため前述の *avr* 遺伝子と合わせて *avr/pth* family と呼ばれている。これらの中には、*X. c. pv. malvacearum* の *avrb6* の様に宿主に対する水浸状斑形成という病原性を持つと同時に非宿主に対する HR 誘導という抵抗反応誘導能を持つという二面性を持つものがある。*pthA* も宿主であるカンキツのかいよう形成に関与すると同時に、少なくとも2品種だけであるが非宿主であるダイズに対する HR 誘導という二面性を持ち合わせていると報告されている(71)。カンキツかいよう病菌の野性株には、*Xanthomonas* 属細菌の *avr* 遺伝子に特有の繰返し配列が3~4箇所存在する。本研究では、これらの構造と機能について比較し解析した。

## 材料および方法(MATERIALS AND METHODS)

### 1. 供試菌株および培地

本研究において供試した菌株及びプラスミドは Table 1 に示した。大腸菌は LB(Luria-Bertani)培地、37°Cで培養した。カンキツかいよう病菌をはじめとした *Xanthomonas* 属菌は YP(Yeast-Peptone)培地(1% Peptone, 0.5% Yeast extract, pH6.7)、28°Cで培養した。固形培地作成時には、1.5%の寒天末を添加した。また、過敏感反応誘導培地として、最少培地(3% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 0.25% NaCl, 0.1% Casaminoic acid)に最終濃度が 1.0%になるようにカンキツ葉の磨碎汁を添加したものをを用いた。本研究で用いた抗生物質の最終濃度は次の通りである。カナマイシン(Km)75 μ



g/ml、ナリジキシル酸(Nal)50  $\mu$ g/ml、テトラサイクリン(Tet)25  $\mu$ g/ml、  
スペクチノマイシン(Sp)25  $\mu$ g/ml

## 2. 一般的 DNA 操作について

Total DNA 抽出、アルカリ法および沸騰法によるプラスミド DNA の抽出、  
臭化エチジウム存在下での塩化セシウムの密度勾配(超遠心)による DNA の  
純化、アルカリフォスファターゼによる脱リン酸処理、アガロースゲル電気  
泳動法による DNA の分離、超遠心条件下でのショ糖密度勾配による分画、  
ライゲーション、制限酵素地図の作成は Maniatis(53)と Ausbel(3)に従った。  
制限酵素、アルカリフォスファターゼ、T<sub>4</sub>DNA リガーゼ、T<sub>4</sub>DNA キナーゼ、  
ニックトランスレーションキットはニッポンジーン社製を用い、取り扱い  
は説明書に従った。また、*In vitro*  $\lambda$  packaging kit(パッケージングキット:  
STRATAGENE.)やアガロースゲルからの DNA 抽出用キット(QUIAGEN Co.)  
はそれぞれの説明書に従った。なお、サザンハイブリダイゼーションにおい  
て供試した DNA は制限酵素で完全分解したものをを用いた。ハイブリダイ  
ゼーション、プロッティングなどの方法は Maniatis に従った。ハイブリダイ  
ゼーションは温度を 65°C に設定して行った。

## 3. 供試したプローブについて

本研究において *hrp* 遺伝子を解析をするために行ったハイブリダイゼーションのプロー  
して、カンキツかいよう病菌の *hrp* 遺伝子を 20kb 以上有するコスミドクローン pXCF1  
および pXCF13-44 を供試した。また *apl* 遺伝子の解析のため、*avrBs3* family 特有の  
し配列の一部を選択しプローブ(RU2)として供試した。

## 4. RFLP 解析

RFLP の比較において、本研究では 1kb 以上の断片を用いた。各菌株の RFLP



パターンはそれぞれのバンドの有無をもとに数値化した。それらをもとに NTSYS-PC version 1.8 の Qualitative program を用いて、類似性を算出した。樹形図は、類似性をもとに NEIGHBOR program in PHYLIP package の unweighted pair group method with averages (UPGMA)を用いて作成した。

#### 5. Total DNA ライブラリーの構築

カンキツかいよう病菌の NA-1 株から抽出し超遠心精製を行った Total DNA は、*Sau3A* I で部分分解し、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化処理を行った後、ショ糖密度勾配による分画法により、25kb 以上の長さの断片のみの分画をとりこれをライゲーションに利用した。この制限酵素断片は、*Bam*H I で処理した pLAFR3 にライゲーションした。ライゲーション後の DNA は Gigapack Plus packaging kit (STRATAGENE) でパッケージングした。パッケージングによって生成したファージを *E. coli* DH5 $\alpha$  に感染させた。観戦後の大腸菌は 40  $\mu$ l の X-gal (20mg/ml) と 40  $\mu$ l の IPTG (20mg/ml) を塗布したテトラサイクリン入りの LB-plate に塗布し 37 $^{\circ}$ C で 1 ~ 2 日間放置。白いコロニーをピックアップした。

#### 5. シークエンス

本研究で調査した領域の塩基配列を調査するために、その領域のクローンをもとにサブクローンを作成する方法とデリーションシリーズを作成する方法の 2 つを用いた。また、シークエンスはダイデオキシ法(63)に基づいた PCR タイプのシークエンシングキット (Sequitherm cycle-Sequencing kit, Epicenter Technology) とオートシークエンサー (LI-COR 社製) を利用した。解析には、Base image IR (LI-COR) と GENETYX (ソフトウェア開発株式会社) を、ホモロジー検索などは DDBJ (DNA Database of Japan) を利用した。



## 6. エレクトロポレーション(85)

供試した菌体は、波長が 600nm の時の吸光度が 0.6 になるまで培養し、4 回滅菌蒸留水で洗浄し、菌濃度が  $2 \times 10^9$  cfu/ml になるように、30%グリセロール水溶液に懸濁した。大腸菌の場合、40  $\mu$ l の菌液に 2  $\mu$ g の plasmid DNA を混合したものに、エレクトロポレーター(Electro square porator. T820FE: BTX)でパルスを加え(99  $\mu$  sec. 1.80kV. 1 回)形質転換を行った。パルスを与えたらすぐに glucose 水溶液(終濃度 20mM)と  $Mg^{2+}$  溶液(終濃度 10mM  $MgSO_4$ , 10mM  $MgCl_2$ )を添加した YP 培地を加え 27°C で 1 時間以上静置した。静置後菌体は 4000rpm. 10min で集菌し、100  $\mu$ l の滅菌蒸留水で懸濁した後、適切な抗生物質を含む LB-plate に塗布した。*Xanthomonas* 属菌株の場合、40  $\mu$ l の菌液に 0.5  $\mu$ g の plasmid DNA を混合したものに、エレクトロポレーター(Electro square porator. T820FE: BTX)でパルスを加え(99  $\mu$  sec. 3.00kV. 10 回)形質転換を行った。パルスを与えたらすぐに glucose 水溶液(終濃度 20mM)と  $Mg^{2+}$  溶液(終濃度 10mM  $MgSO_4$ , 10mM  $MgCl_2$ )を添加した LB 培地を加え 27°C で 30 分放置した。放置後菌体は 4000rpm. 10min で集菌し、100  $\mu$ l の滅菌蒸留水で懸濁した後、適切な抗生物質を含む YP-plate に塗布した。

## 7. 接種試験および供試した植物体

種皮をむいたナツダイダイの種を水を含ませた脱脂綿を入れた滅菌シャーレに入れ 27°C で一週間放置し発芽させた後、プランターに植え人工気象器内で 27°C で一週間以上栽培し、本葉が 2 枚以上展開した後、温室に移して栽培し 2 カ月以上たったものを接種に用いた。タバコ(cv. Blite Yellow)、ダイズ(cv. Halosoy, cv. Komamidori)においても、同様である。菌液は  $1.0 \times 10^8$  cfu/ml の菌液を集菌し滅菌蒸留水に懸濁したのち、(針のない)注射器で細胞間隙に



注入した。接種後、人工気象器内で 27°C に保って栽培した。

#### 8. カルスの培養と化学発光の測定

本研究で供試したタバコ培養細胞 BY2 は、MS 培地(日本製薬株式会社)で 27°C で一週間振盪培養し、その後継代培養した。化学発光の測定には継代培養後 4 日目のものを用いた。タバコ培養細胞は洗浄用バッファー(175mM mannitol, 0.5M CaCl<sub>2</sub>, 0.5M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5mM MES pH5.7)に入れ 100rpm.30 分振盪洗浄した後、吸引濾過して buffer を捨てる。洗浄した培養細胞は、1.5g ずつ化学発光測定機の測定皿に分け、26°C で 30 分放置し、エージング処理を行う。エージング処理後タバコ培養細胞に、10<sup>8</sup>cfu/ml の濃度になるようにリン酸バッファー(pH 7.0)で懸濁した菌液を加え測定に用いた。

#### 9. IAA の抽出と検出

培養液の上清を用いる場合は供試菌株を 100ml の最少培地で 27°C で一夜培養した後、培養物を遠心(5000rpm. 10 分)し、上清を 50ml の酢酸エチルの入った分液漏斗に移す。分液漏斗を 1 分以上激しく振り可溶成分を溶出させ、酢酸エチルをナス型フラスコに移した。この溶出を 3 回繰り返した。カンキツ葉から抽出する場合は、野性株を 1.0x10<sup>8</sup>cfu/ml カンキツ葉に接種し、接種後 0、1、2、3、5 日のカンキツ葉 3g を用いた。カンキツ葉は液体窒素で冷却し、乳鉢で破碎した後、エチルアルコールで懸濁し可溶成分を抽出する。IAA の極性に基づいて抽出液を精製するため、分液漏斗にクロロホルムを入れ、1 分以上激しく振り、クロロホルム層を廃棄した。同様の作業を、ベンゼンを用いても行った。次に 50ml の酢酸エチルを加え、分液漏斗を 1 分以上激しく振り可溶成分を溶出させた。この溶出を 3 回繰り返した後、塩類を除去するため溶出液に蒸留水を加え、分液漏斗を 1 分以上激しく振り、水層を廃棄し、酢酸エチルをナス型フラスコに移した。ナス型フラスコに移



した酢酸エチルはロータリエバポレーターを用い40℃で蒸発乾固させた。500  $\mu$ l のエチルアルコールで残渣を溶解させた。溶液は薄層クロマトグラフ用のシリカゲルプレート(Silicagel 70 F254 plate:和光製薬)に10  $\mu$ l 滴下し乾燥させる。乾燥後プレートは、展開溶液(isopropanol : 28% ammonia : distilled water = 10 : 1 : 1)を充満させた展開槽にスポットした部分を下にして入れ、暗黒下で30分放置して展開させる。展開後、プレートを乾燥させ、100℃で10分間放置し、呈色溶液(サルコフスキー試薬:203g, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 300ml FeSO<sub>4</sub>.cong, 500ml distilled water)を噴霧して呈色させる。本研究では対照としてインドール(Indole)、インドール酢酸(LAA)、インドール酪酸(IBA)、インドールアセトニトリル(INA)、インドールピルビン酸(IPA)、トリプトファン(Trp)を用いた。

## 結果(RESULTS)

### 1. RFLP 解析について

#### 1.1. カンキツかいよう病菌の野性株の場合

本研究でプローブとして用いた pXCF13-38、pXCF13-44 の供与体である L-9 をはじめとした14菌株についてサザンハイブリダイゼーションを行った。pXCF13-38 をプローブとして用いた場合も pXCF13-44 をプローブとして用いた場合も、どちらも RFLP パターンは完全に一致した。このことから、同一 pathovar 内では共通の *hrp* 領域を持っていると考えられた(Fig. 1)。

#### 1.2. その他の病原性 *Xanthomonas* 属細菌の場合

カンキツかいよう病菌の場合だけでなく、その他の *Xanthomonas* 属細菌においても同様の結果が得られるかという点について調査を行った。

供試した全ての菌株において相同なバンドが検出され、供試した菌株の全てにおいて *hrp* 相同領域が存在することが判明した。また、制限酵素断片のパ



ターンにおいては同一 pathovar 内では高い類似性を示したが、その一方で異なる pathovar 間ではその差が顕著なものであった。同一の pathovar の場合においては、どちらのプロープの時にも 80%以上の類似性を示したが、異なる pathovar の場合においては、全て 60%以下の類似性を示していた。このことから、構造だけに限って言えば *hrp* クラスタはそれぞれの pathovar において異なるクラスタを持っていると考えられる。また、これらについてクラスタ解析を行ったところ、カンキツかいよう病菌はその他の *Xanthomonas campestris* pathovars と同じグループに属するものと考えられた(Fig. 2, 3)。

### 1.3. 非病原性 *Xanthomonas* 属細菌の場合

pXCF13-38 を用いた場合は、供試した非病原性 *Xanthomonas* 属細菌 8 菌株中 7 菌株において相同性を示すバンドが検出された。Car1 と Car6(ともにニンジンからの分離株)、ダイズ X8103(ダイズからの分離株)とクズ 3by(クズからの分離株)の RFLP パターンを比較したところ、その相同性は 70%を越えるものであった。一方、lettuce79-2 と lettuce79-4(ともにレタスからの分離株)においてそれらの RFLP パターンは一致せず、それ以外の組み合わせにおいても RFLP パターンの類似性は低かった。このことから、非病原性 *Xanthomonas* 属細菌にも *hrp* 相同領域は存在し、菌株ごとの多様性もあるとは考えられるが分離植物の種類と菌株の RFLP パターンには相関がないと考えられた(Fig. 4)。

## 2. *apl* 遺伝子の解析

### 2.1. サザンハイブリダイゼーションによる解析

#### 2.1.1. プロープの選択



本研究では、*Xanthomonas* 属細菌の非病原性遺伝子の一つである *avrBs3* family の存在を調査するために使用したプローブの塩基配列について検討した。まず、GENBANK に登録されている他 *avrBs3*, *avrBsF*, *avrb6*, *avrXa10* を用いて繰り返し配列内で共通し、次にそれ以外の遺伝子と比較し相同性が低い領域を探し、結果として塩基配列(24bp: GGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTG)を選択し、この塩基配列をもとに人工合成した DNA をプローブ(RU2)として用いた。

#### 2.1.2. カンキツかいよう病の野性株の場合

本研究では、カンキツかいよう病の野性株での *avrBs3* 様領域の存在について調査するため、Total DNA ライブラリーの供与体である NA-1 や Tn5 挿入による病原性欠損変異株の供与体である L-9 を含むカンキツかいよう病菌 10 菌株の Total DNA および plasmid DNA について RU2 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。この時、Total DNA は *EcoR* I および *BamH* I で処理したが、何れの場合も、RFLP パターンと本数にの違いが見られたが、ほぼ共通していた。また、*EcoR* I を用いたときには 3~4 本のバンドが検出され、NA-1 においては 6.5、16、23kb の 3 本のバンドが検出された。このパターンは 2 菌株(OM, IV-1)を除いて共通していた。*BamH* I を用いた時にも 3~4 本のバンドが検出され、NA-1 において、3.1、3.3、3.9kb の 3 本のバンドが検出された。これらの内、*pthA* の *BamH* I 断片と同じ大きさ(3.3kb)のものを *apl1* (*avr/pth* like)、残りの 2 本の内、短い方から *apl2*(3.1kb)、*apl3*(3.9kb)とした。

供試した菌株の RFLP パターンは若干の違いが見られたもののほぼ共通していた。この結果は plasmid DNA について調査したときと同様であった。このことから、これらの領域が plasmid 上に存在することが判明した(Fig. 5)。



### 2.1.3. 非病原性 *Xanthomonas* 属細菌の場合

分離植物に対する再接種によって、分離植物に対する病原性がないとされている非病原性 *Xanthomonas* 属細菌 8 菌株の場合は、ニンジンから分離した非病原性菌株 Cal6 において *Bam*H1 で処理したときは 4.2kb の断片が、*Eco*R I で処理したときは 5.5kb と 20kb の断片が検出された。しかしながら、それ以外の 7 菌株からは検出されなかった。このことは、*avrBs3/pth* 様領域が病原性に関わる領域と考えられた。なお、Cal6 において検出された領域は、実際には機能していないか、病徴発現に必要な領域が欠損しているものと考えられた(Fig. 6)。

### 2.1.4. Tn5 挿入による病原性欠損変異株の場合

カンキツかいよう病菌の野性株 L-9 への Tn5 挿入による病原性欠損変異株 F-1~10 全てにに対する RU2 を用いたサザンハイブリダイゼーションでの RFLP パターンが野性株のそれと異なっていた。特に、*Bam*HI 断片においては *pthA* のそれと同じ長さの断片(3.3kb)が欠損しているのが確認された。しかしながら、Tn5 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行っても、この断片への Tn5 挿入は確認されなかった(Fig. 7)。それ以外の断片については、F-1、F-2、F-4、F-8 の RU2 相同領域の RFLP パターンが野性株の RFLP パターンと異なっていた。*Eco*R I 処理した時、F-1、F-2、F-4 の 23kb の断片が無くなり、代わりに 27kb のバンドが見られた。また、F-8 は 6kb の断片が無くなり、代わりに 4kb のバンドが見られた。この結果を確認するため、F-1、F-2、F-4、F-8 について DNA の濃度を三段階(5、10、20  $\mu$ g)に設定し RU2 を用いたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ同様の結果であった(Fig. 8)。

以上から、F-1、F-4 については繰返し配列を含む 23kb の *Eco*R I 断片に Tn5 が挿入し、シフトしたものと考えられた。また、カンキツかいよう病の



野性株に対する RU2 を用いたサザンハイブリダイゼーションの結果からこれら領域はプラスミド上にもあることが判明しているが、F-8 は Tn5 の挿入ではなく、プラスミドのキユアリング、組換えなどによる繰返し配列を含む領域が変化したものであると考えられた。次に、制限酵素を *Bam*H I に変えて同様の実験を行ったところ、F-4 においてバンドのシフトが見られたのに対して、F-1 では見られなかった。これは、同じ *Eco*R I 断片でありながら、F-4 では繰返し配列のある *Bam*H I 断片に Tn5 が挿入されているのに対して、F-1 では繰返し配列の近隣の *Bam*H I 断片上の領域に挿入されているためであると考えられた(Fig. 8)。また、F-8 は *Bam*H I を用いたときでも野性株に対し RFLP パターンに違いが見られたが、野性株と比較して全ての断片が短いものになっているので、Tn5 挿入によって長さが変化していると考えられる断片は見られなかった。

この結果は *Eco*R I を用いた時のものと一致する。また、Tn5 挿入部位を確認するために pSup2021 の Tn5 を持つ *Eco*R I 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、F-4 のみにおいて、検出されたバンドの位置は RU2 をプローブとして用いたときのそれと一致した。以上から、F-4 が繰返し配列を含む領域の変異株であることが判明し、この領域が病原性に関わるものであると考えた。

## 2.2 Total DNA ライブラリーの構築

NA-1 由来のコスミドクローンは DH5  $\alpha$  に導入し、抗生物質(テトラサイクリン)による選抜と Blue White selection によってコスミドクローンを選抜した。この時、プレート一枚当たりの転換体の数は、300~400cfu。そのうち blue colony の数は 40~60cfu であった。以上から、転換効率は  $4 \times 10^{-3}$  cfu/cfu recipient であり、転換体全体の約 15%は自己結合を起こすと考えられた。ランダムに選抜した 30 菌株について制限酵素解析を行ったところ、



全てのクローンにおいてそのバンドのパターンは異なるものであり、また平均断片長は約 25kb であった。この平均断片長(25kb)、*X. c. pv. citri* の総染色体長(*E. coli* をもとに約 5Mb と仮定)をもとに、Clark と Carbon の式を用いて 99%の確率で目的の領域を採るために必要なクローンの数を計算したところ、1151 のクローンが必要であることが判明した。そこで、本研究ではその 2 倍近くになる 2100 クローンを選抜した。それらに対して、RU2 をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーション解析を行い、15 個のクローンを選抜した。

### 2.3 *avr* 様遺伝子の部位特定と *avr/pth* family 特有の繰返し領域の制限酵素解析

ライブラリーから選抜したコスミドクローンを用いて、2つの *avr* 様領域(*apl1*, *apl2*)を有する約 50kb の領域について制限酵素地図を作成した(Fig. 9)。本領域を含むクローンのうち幾つかは Fig. 9 に示した。本研究で用いた制限酵素は *EcoRI*、*BamHI*、*HindIII*、*FstI*、*XbaI*、*BalI* であった。その結果、供試したこれらの酵素について、*pthA* とほぼ同様の位置に制限酵素の認識部位が存在していた。特に *apl1* については、完全に一致していた。

*avr/pth* family の遺伝子はその内部に *BamHI* 断片を持ち、更にその内部に特有の繰返し配列を有する。RU2 とハイブリダイズした *apl1*、*apl2*、*apl3* が *avr/pth* family で見られる様な繰返し配列を持つか解析した。繰返し配列の解析のため *apl1*、*apl2*、*apl3* の *BamHI* 断片のクローンを *BalI* で部分分解し、アガロースゲル電気泳動を行った。3者とも *avr/pth* family 特有の繰返し配列が示す 102bp ごとのラダーを形成し、その数も少なくとも、18(*apl1*)、15(*apl2*)、23(*apl3*)であった。また、RU2 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った結果、ラダーの全ての断片において相同性を示すシグナルが検出された(Fig. 11)。



## 2. 4. *apl1* および *apl2* の機能に関する解析

### 2. 4. 1. カンキツかいよう病菌の Tn5 挿入による病原性欠損変異株

#### 2. 4. 1. 1. Tn5 挿入による *apl1* 変異株

病原性欠損変異株 F-2 および F-4 に *apl1* を持つコスミドクローン pNK17、*apl2* を持つ pNK6、*apl3* を持つ pNK1、*apl2* および *apl3* を持つ pNK2 を導入しカンキツへの接種後の病原性について調査した。これら転換体は、triparental mating 法では作成されなかった。その原因としてはメチレーションによるものが考えられた(18)。そのため、エレクトロポレーション法で作成した(Table.2)。野性株が接種後5~7日で病斑を形成したのに対し、*apl1* を有する転換体は野性株と同様に接種後5~7日でかいよう病斑を形成したが、*apl2* を有する転換体は接種後14~21日と、病斑の形成に若干の遅れが見られた。一方、*apl3* を持つを有する転換体は接種後30日以上経過しても病斑を形成しなかった。以上から、*apl1* および *apl2* が病原性の発現に機能するものと考えられた(Table 3, 4, Fig. 12, 13)。

*apl3* を有する転換体が病斑を形成しなかった原因として、実際に転写、翻訳が行われていないことが考えられたため、APL3 上に Tn3-Spice との遺伝子融合体を形成し、その氷核活性の有無を見ることで、その領域の転写翻訳活性を調査した(50)。その結果、10カ所挿入されたもののうち3菌株において氷核活性が見られ、転写翻訳が実際に行われていることが判明した(Fig. 10)。

#### 2. 4. 1. 2. それ以外の病原性欠損変異株の場合

カンキツかいよう病菌の病原性欠損変異株8菌株(F-1~3、F-5、F-7、F-8、F-10)を選択し、これらに *apl1* および *apl2* を持つコスミドクローンをエレクトロポレーション法で導入した。*apl1* を有する F-5、F-7 の転換体については、接種後30日以上経過しても病斑を形成しなかったが、他の菌株については、*apl1* を有する転換体を接種した場合は野性株と同様に接種後5~



7日でかいよう病斑を形成した(Table 4)。また、 $10^6$ cfu/ml で接種するとカンキツ葉内での死滅すると言う特徴を有する F-8 に変異領域を有するコスミドクローン pXCF10-88 を導入し、カンキツに接種したところ、カンキツ葉内での死滅は見られなくなったが、*apl1* を有する転換体で同様の実験を行った場合は変異株と同様に急速に死滅していった(Fig. 11)。

#### 2. 4. 1. 3. *hrp* 遺伝子の変異株の場合

マーカーエクステンジ法によって作成された *hrp* 遺伝子の変異株 2 菌株 (NH38-15、NH44-15) に *apl1* を導入しカンキツ葉に接種した場合、30 日を過ぎてもかいよう形成は見られなかった。このことから *hrp* 遺伝子は *pthA* の発現に必要とされる領域であると考えられた(Table 4)。

#### 2. 4. 2. 非病原性 *Xanthomonas* 属細菌の場合

分離植物に対する病原性がないとされている非病原性 *Xanthomonas* 属細菌からレタスから分離した 2 菌株(lettuce79-2、lettuce79-4) に *apl1* を導入しカンキツ葉に接種した場合も 30 日を過ぎてもかいよう形成は見られなかった(Table 4)。

#### 2. 4. 3. トマト斑点細菌病菌(*X. c. pv. citri*)の場合

野性株をカンキツ葉に接種した場合、30 日後に接種部位を中心に組織の壊死が見られるが、*apl1* を有する転換体を接種した場合は接種後 30 日では壊死が見られず、代わりに接種部位において組織の肥大と思われる状態が観察されたが、かいようの形成までにはいたらなかった(Table 4, Fig. 12, 13)。

#### 2. 4. 4. *hrp* 遺伝子と *apl* 遺伝子を導入した大腸菌の場合

核果類かいよう病菌の *hrp* 遺伝子のクローン(pHIR11)と *apl1* のクローン



(pNKBH1)を有する大腸菌をカンキツ葉に接種したところ 90 日後に葉に斑点が見られ、この部分の組織を観察したところ、周辺に比べ肥大したカンキツの細胞、そしてその細胞の周辺に細菌と考えられる粒子が確認された(Fig. 12, 13)。この特徴は、*apl1* を有するクローン(pNKBH1)、*apl2* を有するクローン(pNKHE2)、*hrp* 遺伝子のクローン(pHIR11)の3つのクローンを持つ大腸菌を接種したときに顕著に見られた。なお、pHIR11 と *apl2* のクローン(pNKHE2)や pHIR11 と *apl3* のクローン(pNKHE1)を持つ大腸菌をカンキツ葉に接種したときは斑点は見られなかった(Table 4, 5, Fig. 12, 13)。

## 2.5. 塩基配列の解析

### 2.5.1. APL1 の塩基配列の解析

#### 2.5.1.1. ORF 内部の領域

##### 2.5.1.1.1. *pthA* と共通している領域

機能的にかいよう形成能を持つ *apl1* の塩基配列を決定し、最初に *apl1* の塩基配列を解析し *pthA* と比較した。構造領域においては開始コドンから繰返し配列の5'末端(348bp~1211bp)、繰返し配列の3'末端から始まる Leucine zipper(2997bp~3419bp) や PthA protein が核内に侵入するときに必要な核局在部位(3405bp~3419bp, 3540bp~3554bp and 3648bp~3662bp)を含めて100%共通していた(Fig. 14)。

##### 2.5.1.1.2. *pthA* と異なる領域

繰返し配列における相同性は96%であった。この領域における違いは可変領域で見られたものであった。*apl1* の繰返しは、全ての *avrBs3/pth* family 型遺伝子で見られるように102bpを一単位として、*pthA* で見られるように



17.5 単位で成り立っている。

これらは、それぞれの可変領域での相違から区別することが可能である。これは、アミノ酸配列の場合においても同様である。繰り返しのそれぞれは特定の 14nt、4a.a.を除いて、互いに共通の配列を有する。塩基配列の変化は可変領域において集中して見られており、14bp のうち 12bp の DNA が翻訳後のアミノ酸配列の変化に影響している。可変領域での塩基配列の変化は、かなりの割合でこの領域の翻訳に影響している。可変領域におけるアミノ酸の種類と構造との相関は無いと考えられたが、12番目においてアミノ酸が欠損しているユニットの存在は構造に大きな意味を持つものと考えられた。可変領域のアミノ酸の種類から、*pthA* の場合、各繰り返しユニットを 11パターンに分類できる。このとき *apl1* は 8種類であり、*pthA* に存在する繰り返しの内 3種類が存在していない。また、その並び方についても 18の繰り返しにおいて *pthA* に一致するのは 10単位であった(Fig. 15, 16, 17)。

#### 2.5.1.2. ORF の外側について

また、構造領域以外の部位について調査するため、*apl1*、*apl2*、*apl3* の上流(開始コドンから上流 247bp)下流(終止コドンから下流 111bp)部分の塩基配列を解析し *pthA* と比較したところ、制御領域では両方とも -10、-35領域および SD 配列は共通していた。また、*pthA* の 3'末端側(101~162bp)および 5'末端側(3889~3950bp)の両方に見られる Inverted repeat (TLR)も共通していた。しかし、Inverted repeat (TLR)の外側の塩基配列は 2つの領域において、異なっていた(Fig. 17)。

#### 2.5.2. APL1 と APL2 および APL3 との塩基配列の比較

次に、*apl2* および *apl3* の塩基配列について調査するためにそれらの塩基配列を解析し、前述の *apl1* の塩基配列と比較した。構造領域の開始コドンの



一部から繰返し配列の 5'末端側、繰返し配列の 3'末端から始まる Leucine zipper、核局在部(NLS)を含めて 100%共通していた。構造領域以外の領域において、制御領域では両方とも-10、-35 領域および SD 配列は共通していた。また 3'末端側(101~162bp)および 5'末端側(4253~4314bp)の両方に見られる Inverted repeat の塩基配列も *apl1* のそれと共通していた。これら領域においては、*pthA*、*apl1*、*apl2*、*apl3* 何れも共通している。一方で、繰返し配列においては繰返しの数やその並び方において、違いが見られた。*apl1* の繰返しは、*pthA* と同様に 17.5 単位で成り立っているが、*apl2* の場合は 15.5 単位であり、*apl3* の場合は 23.5 単位であった。また、その並び方も、一致した繰返しは 1、2、3、7、8、9 番目と 23.5 ユニットある内の 6 単位であり、殆ど一致しなかったともいえる。また *apl1*、*apl2*、*apl3* 各領域に共通して見られた Inverted repeat (TLR)の外側の塩基配列は全ての領域において、異なっていた。なお、*pthA* の Inverted repeat (TLR)の外側の領域で下流側の塩基配列はカンキツかいよう病菌のゲノム上に存在していた(Fig. 14, 15, 16, 17, 18)。

## 2.6. *apl1* と *apl2* の過敏感反応誘導能における調査

*apl1* および *apl2* の抵抗反応誘導能について調べるため、野性株(L-9)、*apl1* および *apl2* の領域の変異株(F-4、F-8)とタバコ培養細胞を用いて、抵抗反応の極初期に出る化学発光を測定した。最少培地で培養した野性株や変異株をタバコ培養細胞に添加した場合、抵抗反応誘導培地で培養した野性株や変異株をタバコ培養細胞に添加した場合の何れでも、30 分後には 1 つ目のピークが、60 分後には 2 つ目のピークが観察された。また、これら菌株を抵抗反応誘導培地で培養し、 $10^8$  cfu/ml の濃度でタバコ葉に接種したところ、全ての菌株において 48 時間後には過敏感反応を誘導した。また、ダイズにおいて同様の調査を行ったところ、この時も全ての菌株において過敏感反応を



誘導した。また、*apl1* および *apl2* のサブクローンについても同様にタバコとダイズに接種したが過敏反応は誘導されなかった。*apl1* や *apl2* がコードしているタンパクが過敏反応誘導に関与しないと考えられた(Fig. 19)。

## 2.7. カンキツかいよう病菌細胞外分泌物質についての解析

トリプトファンを添加した最少培地で野性株を培養した時、培養液の抽出物、TLC plate 上での RF 値、HPLC でのピークのパターン等から、IAA が検出された。このことから、カンキツかいよう病菌が IAA 生成経路を持つことが考えられた。また、*apl1*、*apl2* の変異株である F-4、F-8 について同様の調査を行ったところ、野性株の時と同様に、トリプトファンを添加した時のみ IAA が検出された。以上から、*apl1*、*apl2* は IAA 生成に直接関与しないことが示唆された。また、無添加の最少培地やカンキツ葉を添加した最少培地で同様の実験を行った結果、IAA は検出されなかった。またカンキツ葉からは、トリプトファンも IAA も検出されなかった。カンキツかいよう病菌の IAA 生成はかいよう形成に直接関与しない可能性が考えられた。

また、カンキツ葉から抽出を行った結果、トリプトファンも IAA も検出されなかった。以上から、カンキツ葉内には、この実験で用いた量のトリプトファンは存在せず、カンキツかいよう病菌の IAA 生成が自然条件下で起こりうるものとは考え難いといえる。この現象から言える可能性の 1 つとしてカンキツかいよう病菌がカンキツ葉内の組織に対し IAA の生成を誘導していることが考えられた。そこで、野性株を接種したカンキツ葉からのインドール化合物抽出を行ったが、どのケースにおいてもインドール化合物は検出されなかった(Fig. 20)。

## 考察(DISCUSSION)



RU2 をプローブとした非病原性 *Xanthomonas* 属菌株やカンキツかいよう病の野性株におけるハイブリダイゼーションでの結果は、状況証拠的ではあるが本領域が病原性に関与していることを示唆していると考えられた。カンキツかいよう病の病原性欠損変異株である F-1~10 におけるハイブリダイゼーションの結果から、*apl1* および *apl2* が病原性に関与していることを示していると考えられた。この点について機能レベルでの調査として行った *apl* 遺伝子を導入したカンキツかいよう病の病原性欠損変異株のカンキツ葉への接種の結果は、病斑形成に要した日数のみをもとにすると *apl3*, *apl2*, *apl1* の順にかいよう形成能が上昇しているものと考えられた。しかし、*apl1* と *apl2* についてはかいよう形成の程度においてはそれほどの差は見られなかったことから評価は保留した。この時点では、少なくとも *apl3* はカンキツにおけるかいよう形成能がないと考えられた。*apl* シリーズを持つサブクローンと核果類かいよう病菌(*F. s. pv. syringae*)の *hrp* 遺伝子のクローン pHIR11 の 2 つを導入した大腸菌をカンキツ葉に接種した結果は、*apl1* の方がカンキツにおけるかいよう形成能が高いことを示していた。以上から、*apl1* が強活性、*apl2* が弱活性、*apl3* が無活性であると考えられた。また、カンキツかいよう病菌の変異株 F シリーズのうち F-5、F-7、F-8 を除く病原性欠損変異株は *apl1* 欠損のみによる病原性欠損変異株であると考えられる。この場合、*apl2* が残っているため、高濃度接種によってかいよう病斑が形成される可能性があることも付記しておく。

前述の 3 つの相同領域 (*apl1*~3) のうち *apl1* は、制限酵素断片の長さ、病原性欠損変異株 F-1~10 における RFLP、F-4 における *apl1* の導入株の病原性の獲得、2 つの LTR に挟まれた領域のうち繰返し配列以外の部分の塩基配列から *pthA* と考えられたが、繰返し配列の塩基配列に *pthA* とは若干の違いが見られた。

また、ユニット数そのものは同じではあるが、アミノ酸配列をもとに分類し



た繰返し配列のユニット11パターンの内3パターンは欠損し、配列においては4、5、6、14、15、16、17の7ユニットが違っていた。この領域が病原性を発揮するためのユニットの配列はある程度可変的である。

野性株 NA-1 において *apl1* 以外の *avr/pth* 相同領域は3つある。その内の1つである *apl3* について機能と構造について調査した。まず機能について調査するため、Tn5挿入による *apl1* 領域の変異株である F-4 に *apl3* 領域を持つコスミドクローンを導入しカンキツ葉に接種したところ、かいようは見られなかった。この原因の1つとして、この領域の転写翻訳が実際に行われていないことが考えられた。まず *apl3* の塩基配列を調査した結果、プロモーター配列、SD配列および終止コドンが *pthA* と同様に存在していることが判明した。このことから、構造レベルではあるが、*apl3* も *pthA* の様に転写・翻訳が行われているものと考えられた。

次に、Tn3-Spice を用いて、本領域の遺伝子融合体を作成し、氷核活性を見ることでこの領域の転写翻訳活性の有無を調べたところ、大腸菌内ではあるが氷核活性が見られたため、この領域において実際に転写翻訳は行われているものと考えられた。なお、*hrp* といった病原性遺伝子において見られる栄養条件による転写量の違い(79, 85)は見られなかった。これより2つの可能性が考えられる。1. *apl3* には元々カンキツ葉に対するかいよう形成能がない。2. *apl2* は単独で作用すると言うより、*apl1* が存在するときのみ、*apl1* と共に相加的に作用する(90)。*avr/pth* family に属する *X. c. pv. malvacearum* の6つの *avr* 遺伝子はそれぞれが単独では水浸状斑を形成する能力に乏しいが、複数になると *avr* 遺伝子の数に応じて水浸状斑の形成能力が増大する事が知られている。*E. coli* を用いた接種の結果では、*apl1* と *apl2* では、相加的と考えられる作用が観察されたが、*apl1* と *apl3* や *apl2* と *apl3* では観察されなかった。この点については、さらに調査する必要があると考えられる。



本研究において、カンキツにおけるかいよう形成能が見られた *apl1* と、カンキツにおけるかいよう形成能が部分的にしか見られなかった *apl2* との違いがどの塩基配列によるものなのか検討するため、二つの領域の繰返し配列以外の塩基配列を比較した。これら2領域のプロモーター領域から繰返し配列までの部分、また *pthA* のドメインとして知られる NLS を含む leucine zipper から終止コドンまでの部分において、完全に一致していた。共通領域の中には leucine zipper や NLS があるが、これらはそれぞれ生体タンパクへの結合、核内への移行という作用を有することが知られている(23, 87)。これらドメインがある以上、かいよう形成能がないとされる *Apl2* タンパクにおいても核内への移行などは行われていると考えられる。もしその通りであった場合、繰返し配列が核内での作用に関与していることになる。もちろんその真偽など詳細については今後の研究課題となる。繰返し配列部も *Apl1* の核内への移行そのものに関与している可能性も考えられるが、もし核内での移行に関与していないなら核内での相互作用に繰返し部が関与している可能性も考えられる。

共通領域を除外すると、これら領域の違いは繰返し配列部分の繰返しの数もしくは塩基配列そのものの違いによるものと考えられた。また、プロモーターや終止コドンの上流 150bp、繰返し配列を除いた構造領域の一部において、*apl3* は *apl1* および *apl2* と一致していた。以上から、本研究で供試した菌株 NA-1 において、カンキツかいよう病菌が持つ全ての *avrBs3/pth* family 遺伝子相同領域は構造遺伝子に限定して言えば、繰返し配列部のみにおいて違いが見られるだけで、そのほかにおいては殆ど一致した塩基配列を持つと考えられた。この傾向は *avrBs3/pth* family 型遺伝子に共通して見られているものである(8, 17)。この事実からも繰返し配列部がかいよう形成にとって重要なドメインの1つであることを示唆するものと考えられた。

繰返し配列における *apl1*~*apl3* の相違は、ユニットの数ばかりでなく、



配列においても認められた。この繰返し配列の違いがアミノ酸レベルで構造にどのように影響するか調査するため *apl1*, *apl2*, *apl3* のシーケンスから推定したアミノ酸配列をもとに Chou-Fasman 法(12)でタンパクの二次構造を推定した。シーケンスが共通しているところは構造も一致しているが、それぞれの領域において異なる塩基配列を有する繰返し配列の部分においては、その構造に違いが見られた。PthA や Apl1 の様にかいよう形成能が強いものは両者とも共通して繰返し配列を有する領域は 1Unit ごとに 1 つの turn 構造が存在するため、全体的にじゃばらの様に規則正しく折り畳まれた構造を取るが、PthA や Apl1 に比べかいよう形成能活性の弱いと考えられる Apl2 になるとこの構造は多少変化し、無活性と考えられる Apl3 になるとこの部分は崩れたものになる。このことは繰返し配列という構造における違いがかいよう形成能という機能における違いに関係する可能性を示唆するものの 1 つであると考えられた。この構造と機能の違いが具体的にどこに起因するか考えるため、病原性の発現とユニットの配列との間の関係を検討してみた。まず病原性を有するとされる 2 つの領域 PthA と Apl1 の間で共通しないユニット(4, 5, 6, 14, 15, 16, 17 の 7 ユニット)、次に病原性を有するとされる 2 つの領域 PthA と Apl1 と病原性に関与しなかった領域 *apl2* との間で共通したユニット(1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 の 7 ユニット)は病原性に関与しないと考えられ除外する。PthA の繰返し領域 17.5 ユニットの内 7 ユニットが欠損しても病原性に変化がなかったと言う報告から、このケースで取り上げられたユニット(9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 の 7 ユニット)も除外の対象とする。残ったものは最後の 18 番目のユニットとアミノ酸が 1 つ欠損している 2 番目のユニットであり、これがかいようの形成に関与するものと考えられた。また、2 番目の B タイプのユニットは 13 番目のアミノ酸が欠損しているが、アミノ酸の欠損はタンパクの構造に変化をもたらすことが多い。そのため、タンパクの構造と言う点から見てもアミノ酸が一つ欠失している



ユニットが2番目にくることは重要な要因となると考えられる。また、PthA、Apl1、Apl2において、ユニットの数、配列に多様性が見られていることは繰返し配列が機能の異なる領域の間ばかりでなく、(機能が同じでも)菌株レベルでも、ユニットの数、配列において多様性を持つと考えられた。

*avrBs3/pth* family 遺伝子が一菌体内に複数コピー存在することは、これらの領域の進化について、例えばこれら3つの *avrBs3/pth* family 型遺伝子相同領域 (apl1,2,3) はもともと複数であったか、それとも1つのものが増えていったのかという点、またどの様に獲得されたのかという点において何らかの知見を与えるものと考えられる。これらの点について考察する際に鍵となるのは、IS (Insertion Sequence) の存在の有無であるが、ISに必要なものは領域の両端での Inverted repeat の存在、Inverted repeat 内部での transposase の存在、Inverted repeat の両端における境界領域の存在であると考えられる(66)。これらの内、両端での Inverted repeat の存在については、*pthA*、*apl1*、*apl2* の共通領域は開始コドンの上流 247bp から、繰返し領域の最初のユニットの変領域までと最後のユニットの変領域から終止コドンの下流 111bp までであるが、その共通領域の 5'末端から下流 60bp までと 3'末端から上流 60bp までは互いに反復繰返し配列(Inverted repeat: IR)を形成していた。この IR によって *avrBs3/pth* family 型遺伝子の移動やコピー数増加が行われると考えられた。この領域は *avrBs3*、*avrb6*、*avrXa10* にも見られ、またこれら遺伝子を持つ植物病原細菌トマト斑点細菌病菌、ワタ角点細菌病菌、イネ白葉枯れ病菌においてもこの領域が複数コピー存在し、特にイネ白葉枯れ病菌に至っては 12~14 コピー以上存在することが知られている(31, 89)。IR 内部での transposase の有無については *avrb6* のケースにおいて指摘された通り Tn3 に近いものであるつまり、挿入領域内部にトランスポゼースを持たないものと考えられる(17)。本研究で用いた病原性欠損変異株 F-1~F-10 は Tn5 挿入により病原性を欠損したものと考えられてい



たがサザンハイブリダイゼーションや *apl1* を導入した形質転換体の接種試験の結果から、病原性欠損変異株 F-1~F-10 は一部の例外(F-5、F-7、F-8)を除いて *apl1* の喪失だけが病原性欠損の原因となっていると考えられた。なお、Tn5 挿入領域が病原性領域と考えられる F-5、F-7、F-8 については後述する。これらは全て、Tn5 挿入時に、すなわち Tn5 の transposase が作用した時に、*apl1* を喪失しているものと考えられた。しかしながら、本当に Tn5 の transposase の作用によるものなのかと言う点については、実際に Tn5 の transposase を用いて調査する必要があると考えられる。この点については今後の検討課題である。

次に IR の両端における境界領域の存在についての検討であるが、この点を調査するために、*apl1*、*apl2* それぞれの IR を含めた境界領域の塩基配列を解析し比較した。これら 3 つの塩基配列は、Inverted repeat を境にその外側は異なる塩基配列を示し、IR の端に境界領域が存在すると考えられた。このことから NA-1 株の *apl1*、*apl2*、*apl3* はもとは 1 つの領域からはじまり、IS による転移によって最終的に増えていったのではないかと考えられた。

また、これら 2 つの領域と *pthA* を比較したところ、やはり IR を境にその外側は異なる塩基配列を示した。この傾向は *avrBs3*、*avrB4*、*avrb6* においても見られた。また、カンキツかいよう病菌のかいよう形成に関わる遺伝子(*apl1* と *pthA*)において、その遺伝子を持つ菌株(*apl1* は NA-1 株、*pthA* は 3213 株から分離)によって、Inverted repeat を境にその外側塩基配列が異なっていたという事は、病原性を持つ領域の存在する位置が菌株間で異なっている可能性を示唆している。ちなみに *pthA* の Inverted repeat の外側の下流域の 76bp (*pthA*; 4199~4275bp) をカンキツかいよう病菌の野性株 L-9 において探したところ、染色体上に存在していた。このことは *pthA* が染色体上に存在し、IR の作用によってプラスミド上に移動した可能性を示唆している。なお、*apl1* と *pthA* において Inverted repeat の下流 28bp の



塩基配列は一致しなかった。これは DDBJ による相同性検索の結果からその遺伝子が *X. c. pv. citri* のプラスミド上に存在するトランスポゾン ISXc5 であったことから(74)、ISXc5 がカンキツかいよう病菌の Inverted repeat の内部に挿入されたためであると考えられた。

報告されている *avrBs3/pth* family 遺伝子は繰返し配列以外は、それぞれが塩基配列において 90%以上の相同性を有している。このことは挿入配列 (IS: Insertion Sequence) の存在の可能性ばかりでなく、異種の *Xanthomonas* 属菌株間における *avrBs3/pth* family の遺伝子が水平移動の可能性を示唆しているものと考えられる。本研究では、カンキツかいよう病菌の *avrBs3/pth* family の遺伝子がプラスミド上に存在していることを明らかにした。同様にトマト斑点細菌病の *avrBs3* やワタ角点細菌病の *avrb6* がプラスミド上に存在していることが報告されている(11, 17)。

Gabriel らは、*pthA* がコードしているタンパクが、植物細胞内の核に存在していることから(23, 86)、このタンパクの核内での信号物質としての機能が示唆されている。以上から前述の *avr/pth* family の 1 つである *pthA* タンパクやそれ以外の繰返し配列をもつ領域がコードしているタンパクが植物細胞に何らかの影響を与えているものと考えられた。また、Swarup らは、*pthA* が実験に供試したダイズ 2 品種において PthA タンパクが直接エリシター的作用を持つことを報告している(72)。そこでこれら領域がコードしているタンパクのエリシター活性についてカンキツかいよう病菌の野生株(L-9)、繰返し配列をもつ領域の変異株(F-4, F-8)と非宿主植物であるタバコ(Blite Yellow)とダイズ(Halosoy, コマミドリ)との間の相互作用について調べた。その結果、どの組み合わせでも過敏感反応が見られ、また化学発光における結果も供試した全ての菌株において差は見られなかった。以上から、非宿主植物であるタバコやマメに対するカンキツかいよう病菌の主要なエリシターは *apl1* および *apl2* タンパク以外に存在する。つまり Apl1 および Apl2 タン



バクがカンキツかいよう病菌において、タバコやダイズにおける過敏感反応の誘導能とは直接的な関係がないと考えられた。本研究では Apl1 タンパクそのものを用いたエリシター活性についての調査にまでは至らなかった。この点については今後の研究課題になるものは思われるが、実際にエリシターとして考えた場合、主要な作用を持つものは他にあり得ると思われるので重要なタンパクとして扱うのは難しい。しかし、植物の抵抗性の進化について考える上では、Apl1 タンパクのエリシター活性の有無は重要な意味を持つものと考えられる(87)。

*X. c. pv. vesicatoria* は、*X. c. pv. citri* と同様に *avr/pth* を持ち、また *hrp* 遺伝子も持っている事が報告されている(8, 65)。機能的に共通項があると考えられる *X. c. pv. vesicatoria* なら *apl1* も機能すると考えられた。そこで *apl1* を導入した *X. c. pv. vesicatoria* をカンキツ葉に接種したが、この結果は少なくともこの2者に関しては *hrp* 遺伝子は分泌という共通する機能に関しては、病原型を越えて作用することを示唆した。つまり、ケースによっては構造ばかりでなく機能まで共通することが考えられた。しかしながら、*hrp* において *cross complementation* が成立しない例も存在する。この点は宿主特異性に深くかかわっているのではないかと考えられた。

*hrp* クラスターの特徴の一つとして、*P. syringae* グループを始めとして *Erwinia* 属細菌 *Xanthomonas* 属細菌、*R. solanacearum* といった主要なグラム陰性植物病原細菌に存在し(4, 10, 21, 32, 46)、特に *R. solanacearum* と *Xanthomonas* 属細菌の間で共通の構造を有することが報告されている。*R. solanacearum* の *hrp* 相同領域が病原性 *Xanthomonas* ばかりでなく non-pathogenic *Xanthomonas* にも存在が確認されたことはそれを裏付けるものと考えられた。同一グループ内ではこれらは構造的に共通していることが報告されているが、本研究における結果はそれを裏付けるものとなった。*X. c. pathovars* において、その RFLP は pathovar によって異なっていた。



ここでの結果から、それらが持つ *hrp* 遺伝子が pathovar に応じて特有の構造を有することが考えられた。本研究では、各 pathovar において最低 2 菌株使用しているが *X. o. pv. oryzae* 以外は全て pathovar 内で共通していた。本研究で供試した *X. o. pv. oryzae* において、race で分かれる傾向が見られた。このことから、*X. o. pv. oryzae* が条件によっては全てのレースにおいて異なる RFLP を有する可能性が考えられた。*hrp* cluster の内部に存在する *hrc* region は機能も構造も共通する領域として知られており、*Xanthomonas* 属においては *hrc* region の PCR 産物の共通性が高いことが報告されており、多様性は主として *hrc* region 以外の部分に存在すると考えられる。本研究で見られた RFLP の多様性は、*hrp* cluster が病原性発現ばかりでなく、植物での生存に必要とされる何らかの形質を有する可能性が考えられる。*hrp* と共に病原性に関わる遺伝子の一つである *avr* gene は、*X. c. pv. malvacearum* のそれを全て欠損させると宿主であるワタでの生育能が野性株に比べ低下することが報告されていることから宿主植物での生存に必要なものと考えられている(89)。この *avr* 遺伝子をプローブとした場合、菌株によって相同領域の有無自体に差が見られた。このことはこの領域が特定の植物の生存に、言い換えれば *hrp* 以上に特異的な病原性の発現に必要とされているものと考えられる。

一方で、*hrp* cluster における構造の多様性は機能を伴うものばかりではなく機能に関わりのない部分も変異が生じているものと考えられるがそうでありながら pathovar で共通しているのは、代々同種の宿主植物の中で生存している間に一種の隔離に似た状況が起こったためと考えられる。*hrp* cluster の構造における多様性は機能を伴うものと機能を伴わないものと言った二面性を持つと考えられる。

今回行った RFLP 解析は *hrp* という病原性遺伝子を probe として行った。この結果は、*X. c. pv. vesicatoria* での *hrp* を用いた研究の結果(48)を支持



するものであり、 pathovar ごとの違いがほとんど見られない従来の生理学的性質に基づいた方法(15, 77, 78)や pathovar との相関が殆ど見られない生理代謝に関与する遺伝子や無作為に選択した遺伝子を probe として行った RFLP 解析(5, 6, 22, 64)とは異なっていた。病原型に基づいた分類同定には、病原性遺伝子の利用が有効であり、中でも多くの *Xanthomonas* に共通して存在する *hrp* region を利用することは、多数存在する *Xanthomonas* 属細菌の pathovar レベルでの比較に有効であると考えられる。またこのことは、*hrp* 遺伝子が病原性に関する領域の進化と生理代謝などに関する領域の進化は違うものであることを示唆しているものと考えられた。

一方、病原性欠損変異株である F-5、*hrp* 領域欠損変異株である NH38-15、NH44-15 に pNK17 を導入した時にはカンキツ用のかいよう形成が見られなかった。このことはかいよう形成において必須とされる因子の存在を示唆するものであった。F-5 の変異領域の塩基配列の解析の結果、本領域が *hrp* 遺伝子の制御に関与する領域であることが推定されている(35, 47)。このことは、*apl1* の発現は *hrp* 遺伝子に依存することを示唆している。非病原性の *Xanthomonas* 属細菌に導入したときも、カンキツにかいようを形成しなかったが、これら非病原性の *Xanthomonas* 属菌株については、構造的には *hrp* 相同領域の存在が確認されてはいるが、機能的には確認されてはいないと考えられる。このことの原因として、少なくとも本研究で供試した菌株については *hrp* クラスターが機能に反映するまで揃っていないことが考えられた。また、この実験の結果は異なる pathovar 間においても *hrp* 遺伝子の相同領域を持つだけでなく、実際に *hrp* 遺伝子が共通に機能することを示唆していた。また、大腸菌を用いた場合の結果は異属間でも実際に *hrp* 遺伝子が共通に機能することを示唆していた。この様に構造レベルばかりでなく機能レベルにおいても属、種を越えて幅広く存在していることから、*hrp* 遺伝子、特に *hrc* 遺伝子は植物病原菌の病原性の発現において共通の役割を担っており、



進化においても極初期に獲得した原始的な領域であると考えられる。*avr* 遺伝子の *hrp* 依存性については、Svresh らの大腸菌や *P.fluorescens* を利用した実験系において報告されている(28)。一方 *avrBs3/pth* family 型遺伝子については、Bonas らが *avrBs3* がトマト斑点細菌病菌の *hrp* クラスタに依存していることを報告しているが(41)、前述の実験系での報告はまだなされていない。しかしながら、本研究における同様の実験系での結果は *apl1* が *hrp* クラスタに依存していることを示唆したばかりでなく、これらが病斑形成の最小単位となる可能性も示唆していた。しかしながらかいよう形成能自体は野生株に比べかなり弱いものであった。この理由として考えられるのは、1.効率の良い発現のためには *X. c. pv. citri* の *hrp* が必要になる。つまり *hrp* 遺伝子が種レベルばかりではなく pathovar レベルで機能的に分化している可能性が考えられる。この点については、まずカンキツかいよう病菌の *hrp* 遺伝子のクラスタを機能が見られる程度まで揃え、その領域を利用する必要がある。これは今後の研究課題となると考えられる。2.かいよう形成には必要とされる遺伝子が不足している。核果類かいよう病菌の実験系では、*avrB* と *hrp* クラスタそしてエンハンサーとして *hrpB* を大腸菌に導入している(24)。本研究でもこのようなエンハンサーが必要であったと考えられる。また、カンキツにおけるかいよう形成には *hrp* 遺伝子が必要であることが判明しているが、これだけでかいようが形成される保証はない。この点については、その領域のクローンが必要となるがこの点についても今後の研究課題となる。また、カンキツかいよう病菌において病斑形成能を有することが植物体内での生存能力に影響するか調査するため、Tn5 挿入によって植物体内での生存能が欠損している F-8 を用いて接種試験を行った。結果として、*apl1* 導入による影響は見られなかったため、本領域の存在が生存能に直接影響を及ぼすことにはならないことが判明した。

かいよう病斑の形成は、最初にカンキツ葉内の組織が肥大するところから始



まる。植物細胞の増生および肥大には、オーキシンをはじめとした植物ホルモンが関与している。植物病原細菌の中には、病原性因子として植物ホルモンを利用するものも存在している。IAA 生産能を有するオリーブこぶ病菌はその典型として知られている。本研究ではまずカンキツかいよう病菌にオーキシン生産能があるかという点について調査した。オリーブこぶ病の IAA 生産経路は前駆体であるトリプトファンがまず *iaaM* 遺伝子によって indol-3-acetamide に変換され、次いで *iaaH* 遺伝子によって IAA が合成される経路をとる。本研究の結果から、カンキツかいよう病菌がこのような IAA 生成経路を持つことが考えられた。しかしながら、最小培地中にカンキツ葉抽出液を添加した培地で同様の実験を行った結果から、カンキツかいよう病菌の体内での IAA の過剰生成が自然条件下で起こりうるものとは考え難く、かいよう病菌が直接生産したとしてもカンキツ葉でのかいよう形成能に直接関与しないと考えられた。また、カンキツかいよう病菌の変異株について同様の実験をしたときも同じ結果であったことから、かいよう病菌の IAA 生産能がかいよう形成にはあまり関係がないと考えられた。もちろん、この点に関しては実際に IAA 生産能欠損変異株を作成した上で調査しなければ結論として言うことはできない。この点については今後の研究課題である。また、この現象から言える可能性の 1 つとしてカンキツかいよう病菌がカンキツ葉内の組織に対し IAA の過剰生成を誘導していることが考えられ、野性株を接種したカンキツ葉からのインドール化合物抽出を行ったが、どのケースにおいてもインドール化合物は検出されなかった。以上から、2 つの可能性が考えられた。1) 生成量が予想以上に低い。2) インドール化合物以外の物質による可能性。1) については、無処理葉からインドール化合物を抽出し、接種した葉から抽出したインドール化合物と比較し相対的に評価する。2) については、植物ホルモン以外の物質による可能性も考えられ、組織の肥大がホルモン以外のものによる可能性も考えられる。何れにしてもこの場合は抽出法



などにおいて今までと異なる化学的アプローチが必要になるものと考えられる。

#### 結論(CONCLUSION)

1. *Xanthomonas* 属細菌の *hrp* クラスターは病原型によって異なった RFLP を有する。
2. 本研究で供試した *hrp* 領域を用いた RFLP 解析は、少なくとも病原型を比較することに有用であり、細菌の同定分類への応用の可能性も考えられる。
3. *hrp* 遺伝子のように病原性に関与し、かつ幅広く存在する領域は、同定分類への応用の可能性も考えられる。
4. カンキツかいよう病菌に存在する *avrBs3* 相同領域は 3 から 4 存在するが、本研究において供試したカンキツかいよう病菌の野性株 NA-1 において *avrBs3* 相同領域は 3 領域存在し、かいよう形成能はそれぞれ強活性、弱活性、無活性であった。
5. それら領域の塩基配列を比較したところ、構造領域においてドメインとして知られている領域などは完全に共通しており、違いが見られたのは、繰返し配列部のみであった。
6. 構造領域以外の部分においては、3 領域とも、その両端において LTR(Long terminal repeat)の存在が確認された。また、LTR に境にした境界領域の存在などから、この LTR が IS である可能性が考えられた。
7. 植物体内における本領域の発現は *hrp* 遺伝子依存である。
8. *hrp* 中でも特に *hrc* の作用は、属及び種を越えて作用する可能性がある。
9. 検出能力の問題もあるが、本領域の作用によって植物ホルモンの誘導が見られなかったことから、かいよう形成には植物ホルモン以外の作用も



存在するか、植物ホルモンが関与しない可能性が考えられた。

#### 摘要(SUMMARY)

*Xanthomonas* 属において特有の繰返し配列を持ち、病原性に関わっている領域は、*avrBs3/pth* family 型遺伝子として知られている。これら領域の特徴として、次の2つが挙げられる。1. 102bp を一単位とした約20ユニットの繰返しを持つ。2. 少なくとも *avrBs3/pth* family 型遺伝子を持つとされる菌株において、機能についてはっきり判明していないものも含めて、その相同領域が複数存在する。この点を利用して、RU2 をプローブとしたハイブリダイゼーションを行い、カンキツかいよう病菌の野性株について調査したところ、その数と RFLP パターンにおいていくらかの種類はあるが、複数の相同領域が存在することが判明した。本研究で供試した NA-1 では3つの相同領域 (*apl1*~3) が存在するが、この中の1つ *apl1* は、制限酵素断片の長さ、病原性欠損変異株 F-1~10 における RU2 をプローブとしたハイブリダイゼーションの結果、F-4 における *apl1* の導入株の病原性の獲得、2つの LTR に挟まれた領域のうち繰返し配列以外の部分の塩基配列から *pthA* と考えられたが、繰返し配列の塩基配列から *pthA* ではないことが判明した。*apl1*~3 を導入した病原性欠損変異株 F-2 や *P. s. pv. syringae* の *hrp* 遺伝子と *apl1*~3 を導入した *E. coli* のカンキツ葉に対する接種の結果から、*apl1*、*apl2*、*apl3* のかいよう形成能はその順で強活性、弱活性、無活性となることが判明した。次に、かいよう形成能とそれぞれの領域の塩基配列を比較するため、これらの構造領域の繰返し配列以外の領域の塩基配列の解析を行った。これら2つの領域の繰返し配列の以外の領域の塩基配列について、3'末端側に機能的なドメインとして報告されている NLS (nuclear localization



sequence)を含めて相同性は 100%であった。*Bal*I で部分分解による繰り返し配列におけるユニット数の調査、その両側の領域の塩基配列についての結果から、両者の違いは繰り返し配列に由来のみ存在すると考えられた。そこで実際に *apl2* の領域を解析し *apl1* や *pthA* と比較してみると繰り返し配列のユニットの数ばかりでなくその塩基配列が *apl1* や *pthA* のそれと大きく異なっていた。このことは、繰り返し配列がかいよう形成能に関与している事を示唆している。そこで前述の三つの領域について各繰り返し配列のユニットを分類し、そのパターンを比較しかいよう形成能に共通するパターンについて考察した。かいよう形成能を持つとされる *apl1* を、カンキツかいよう病菌の病原性欠損変異株 F-5 および F-7、*hrp* 領域の変異株、分離された植物体に対する病原性がないとされる非病原性 *Xanthomonas* 属細菌そして *avrBs3/pth* family 型遺伝子(*avrBs3*)を持つ病原性 *Xanthomonas* 属細菌であるトマト斑点細菌病菌、*P. s. pv. syringae* の *hrp* 遺伝子を持つ *E. coli* に導入して、カンキツ葉に接種した。その結果、トマト斑点細菌病菌と *E. coli* の場合においてのみ細胞の肥大が見られ、それ以外ではカンキツ葉でのかいよう形成は見られなかった。この結果に加え、本研究で供試した F-5 が *hrp* 遺伝子の制御に関わる領域と相同性を示したことから、*apl1* が *hrp* 依存であることを示唆している。*hrp* 遺伝子のクラスターの特徴の1つとして、多くの植物病原性細菌に共通して存在することが挙げられる。このことは病原性の発現における本領域の重要性を示すものであるが、このことから本領域が種および pathovar レベルで相同性を示すものと考えられた。ゆえにこの領域をプローブとして利用すれば *Xanthomonas* 属細菌において、種および pathovar レベルでの分類および同定に有効であると考えられた。そこでカンキツかいよう病菌の *hrp* 遺伝子のコスミドクローン(pXCF13-38)をプローブとした病原性および非病原性 *Xanthomonas* 属細菌についての RFLP 解析を行った。その結果、供試した病原性 *Xanthomonas* 属細菌ばかりでなく供



試 8 菌株中 6 菌株の非病原性 *Xanthomonas* 属菌株も上記 *hrp* 遺伝子と相同性を示した。これらの相同領域 RFLP を見ると、非病原性 *Xanthomonas* 属菌株については、分離した植物体の種類と RFLP パターンに相関は見られなかった。一方、病原性 *Xanthomonas* 属菌株の場合、同一 pathovar 内では RFLP パターンに非常に高い類似性が見られたが、各 pathovar 間では顕著な差が見られた。このことは、*hrp* 領域をプローブとした RFLP 解析は、*Xanthomonas* 属細菌の各 pathovar を選別する上で有用であると考えられた。

#### SUMMARY (TEKIYOU)

Three DNA regions in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, which were homologous to the *avrBs3* gene family commonly found in many *Xanthomonas* spp., were cloned and their nucleotide sequences were determined. The sequences from 247 bp upstream of the translational start site to 111 bp downstream from the termination site of the open reading frames in these regions were identical except in the tandem repeats of 102 bp in the middle of their coding regions. They were found to contain the same leucine-rich region, nuclear localizing signals and inverted repeats as first noted in *pthA* gene of *X. c.* pv. *citri* by De Feyter et al.. Introduction of one of these genes (*apl1*) into a nonpathogenic mutant resulted to form a canker symptom, but the introduction of *apl2* resulted in only partial recovery and that of *apl3* could not revert to form canker symptom even 30 days after inoculation. Comparison of the tandem repeats in these genes provided us more information on the organization of



tandem repeats required for canker formation. The total number of repeats in both Apl1 and PthA was 17.5, as opposed to 15.5 and 23.5 in Apl2 and Apl3, respectively. The amino acid sequences deduced from the 102 bp tandem repeats within *apl1*, *apl2*, *apl3* and *pthA* were variable only at the 3rd, 4th, 12th and 13th amino acids within each repeat, as pointed out by Yang et al.. The amino acids in these variable regions were identical to those of *pthA* except in The third repeating unit. Those of *apl2* and of *apl3* were considerably different from those of *pthA*. Introduction of the cosmid clone of *hrp* cluster of *P. s. pv. syringae* and the clone carrying *apl1* into *Escherichia coli* resulted in the formation of canker like symptom after 2-3 months after inoculation into the leaves of Citrus. Cytological study of the region containing the symptom showed the enlarged plant cells and accumulation of bacteria around the plant cells. This *E. coli* obtained the ability of enlarging the citrus cell. This result suggest that the represece of *apl* genes depend on function of *hrp* gene belonging to Type I secretion system. At least in this case the Type I secretion system works in spite of the gene coding virulent factor and isolated from the strain belonging to other genus. However, the introduction of *hrp* cluster of *X. c. pv. citri* and *apl1* did not lender *E. coli* to form canker-like system. The *hrp* genes of *X. c. pv. citri* may exist not only in *hrp* cluster but except *hrp* cluster, though it is possible that this cosmid clone of *hrp* is incomplete. RFLP analyses for the total DNA of various *Xanthomonas campestris* pathovars and other non-pathogenic *Xanthomonas* spp. were performed using the cosmid clone of *hrp* cluster of *X. c. pv. citri* as the probe. When RFLP analyses for various *Xanthomonas campestris* pathovars performed, all of ten isolates of *X. c. pv. citri* tested hybridized to pXCF13-38 and RFLP patterns of



these isolates were identical. Total DNA of all of the other pathovars of *X. campestris* used in this study hybridized to this probe. RFLP patterns of these isolates within a same pathovar were identical, while most of the patterns of RFLP for each pathovars were distinguishable from each other. Dendrogram in this study shows evolutionary relationship among the pathovars of *Xanthomonas campestris*. The dendrogram in this study was different from the dendrogram in other studies based on biochemical characters and on RFLP analysis using random probes. This result may indicate that *hrp* cluster may evolve independently from other house-keeping genes of xanthomonads. Since RFLP patterns using pXCF13-38 as the probe for each *X. c.* pathovars were shown to be distinguishable each other, this RFLP analysis may be applicable for comparison of *X. c.* pathovars. However this aspect needs further RFLP analysis of other pathovars of *Xanthomonas campestris* before the final conclusion will be made. When RFLP analyses for other non-pathogenic *Xanthomonas* spp. performed, total DNA of six out of 8 non-pathogenic *Xanthomonas* strains hybridized with pXCF13-38. Thus, non-pathogenic xanthomonads seems to have at least parts of *hrp* cluster. Though RFLP patterns of two non-pathogenic isolates from carrot were identical, those of two strains from lettuce were distinguishable. RFLP patterns of the isolates from soybean and from kudzu-vine were identical. Thus, in the case of non-pathogenic *Xanthomonas* isolates, RFLP pattern seems to have no relation to the origin of their isolates.

#### 謝辭(ACKNOWLEDGEMENT)



本研究を進めるに当たりまして、終始温かいご指導と並外れたご尽力を尽くして下さいました露無慎二教授と瀧川雄一助教授、適切なご助言ををはじめとし、様々な面でご尽力を尽くして下さいました農林水産省生物資源研究所の加来久敏氏、落合弘和氏、適切なご意見と pHIR11 を提供して下さいました California 大学の N. T. Keen 氏、多忙にも関わらず論文作成に協力して下さいました静岡大学植物病理学研究室のみなさまにこの場を借りて感謝の意を表させていただきます。

#### 参考文献(REFERENCE)

1. Ackerveken, G. V., Marois, E. and Bonas, U. (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, 87, 1307-1316
2. Arlat, M., Gough, C. L. and Zischek, C., Barberis, P. A., Trigalet, A., (1992). Transcriptional organization and expression of large hrp cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 5, 187-193
3. Ausubel, F. M., Brent, R. and Kingston, R. E., (1987). *Current protocols in molecular biology*
4. Bauer, D. W., wei, Z.-M., Beer, S. V., Collmer, A., (1995). *Erwinia chrysanthemi* Harpin Ech: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol. Plant-microbe Interact.* 8. 484-491
5. Berthier, Y., Verdire, V., Guesdon, J., Chevrier, D., Denis, J., Decoux, G. and Remattre, M., (1993). Characterization of *Xanthomonas campestris* Pathovars by rRNA gene restriction patterns. *Applied and Environmental Microbiology* . 851-859



6. Boccara, M. , Veder, R. , Lalo, D., Lebrun, M. and Lafey, J. F. (1991). Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 4, 293-299
7. Bonas U., Conrads-Strauch J., Balbo I. 1993 Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of a pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol. Gen. Genet.* 238, 261-269
8. Bonas, U., Stall. P. E. and Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* From *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* *Mol. Gene. Genet.*s 218, 127-136
9. Boucher, C. A., Gough, C. L. and Arlat M. (1992). Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annu. Rev. Phytopathology*. 30, 443-461
10. Boucher, C. A., van Gijsegem, F., Barberis, P. A., Arlat, M. and Zischek, C. (1987). *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustred. *J. Bacteriology* 5626-5632
11. Canteros, B., Minsavage, G., Bonas, U., Pring, D. and Stall, R. (1991). A gene from *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* that determines avirulence in tomato is related to *avrBs3* *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 628-632
12. Chou,P. Y. and Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structuer of protains from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology* 47, 45-147



13. Danese, P. N., Murphy, C. K. and Silhavy, T. J. (1995). Multicopy suppression of cold-sensitive *sec* mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 4969-4973
14. Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Herinski D. R. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of *Rhizobium melioli*. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA.* 12, 7347-7351
15. Dobert, R. C., Breil, B. T. and Triprett, B. W. (1994). DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradirhizobium elkanii* and their phyrogenic relationship to those of other nodulating bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 564-572
16. Feyter, R. D., Yang, Y. and Gabriel, D. W. (1993). Gene-for-genes interactions between cotton R Genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr Genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 6, 225-237
17. Feyter, R. D. and Gabriel, D. W. (1991). At Least Six Avirulence Genes Are clustered on a 90-Kilobase plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 423-432
18. Feyter, R. D. and Gabriel, D. W. (1991). Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *J. Bacteriol.* 6421-6427
19. Flor, H. H. (1955). Host-parasite interaction in flux rust. *J. Bacteriol.* 45, 680-685
20. Fsenselau, S. and Bonas, U. (1992). Determinants of pathogenicity



- in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. Molecular plant-microbe interactions 5.390-396
21. Gabriel, D. W., Bruges, A. and Izzo, G. R. (1986). Gene for gene interaction of five cloned avirulence genes from *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* with specific resistance genes in cotton. Proc. Natl. Acad. sci. USA. 83, 6415-6419
  22. Gabriel, D. W., Kingsley, M. T. and Hunter, J. E. (1989). Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) to species and reclassification of all *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Strains. Int. Journal of Systematic bacteriology 14-22
  23. Gabriel, D. W., Yang, Y. Y. and Chakrabarty, R. T. (1996). Roles of nuclear localizing signal sequences in three disease phenotypes determined by the *Xanthomonas avr/pth* gene family. Mol. Plant Microbe Interact. 8, 627-31
  24. Gopalan, S., Bauer, W. D., Alfano, J. R., Loniello, A. O. and He, S. Y. (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* Avirulence Protein AvrB in Plant Cells Alleviates Its Dependence on the Hypersensitive Response and Pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. The Plant Cell 8, 1095-1105
  25. Gough, C.L., Genin, S., Zischek, C. and Boucher, C.A. (1992). *hrp* Genes of *Pseudomonas solanacearum* are Homologous to Pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions. 5, 384-389



26. Gouph, C.L., Genin, S., Lopes, V. and Boucher C.A. (1993). Homology between the *hrpO* protein of *Pseudomonas solanacearum* and bacterial proteins implicated in a signal peptide-independent secretion mechanism. *Mol. Gen. Genet.* 239, 378-392
27. Grimm, C. and Panopoulos, N.J. (1989). The predicted protein product of a pathogenicity locus from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is homologous to a highly conserved domain of several prokaryotic regulatory proteins. *Jour. Bacteriol.* 5031-5038
28. He, S. Y., Huang, H-C., and Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin Pss : A protein that is secreted via the *hrp* pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell.* 73. 1255-1266
29. Herbers, K., Strauch, J.C. and Bonas, U. (1992). Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* Vol.356, 172-174
30. Heu, S. and Hutcheson, W. (1993). Nucleotide sequence and properties of the *hrmA* Locus associated with the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* Gene Cluster. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 5:553-564
31. Hopkins, C. M., White, F. F., Choi, S. H., Guo, A. and Leach, J. E. (1992) Identification of a Family of Avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Pla. Microb. Interact.* 6, 451-459
32. Huang, H. , Hutcheson, S.W. and Collmer, A. (1991). Characterization of the *hrp* cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 and TnpHoA Tagging of genes encoding of genes encoding exported or



- membrane-spanning Hrp proteins. Mol. Plant-Microb. Interactions Vol.4, NO.5, pp.496-476
33. Huang,H.-C., Lin,R.-H.,Chang,C.-J.,Collmer,A. and Deng,W.-L. (1995). The complete *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* 61 Includes two blocks of genes required for Hrpin-pss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia ysc* homologs. Mol.Plant-Microbe Interact. 5, 733-746
  34. Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J., Walters,K., Bettreidge, P., Teverson, D. and Taylor, J. (1991 ). Gene-for-Gene Interaction Between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and phaseolus Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 553-562
  35. Kamoun, S., Kamder, H.V., Tola, E. and Kado, C. I.(1992). Incompatible Interactions Between Crucofers and *Xanthomonas campestris* Involve a vascular Hypersensitive Response: Role of the *hrpX* Locus. Mol. Plant-Microbe Interact. 1, 22-33
  36. Kearney, B., and Staskawicz, B. J., 1990 Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. Nature. 26.385-386.
  37. Keen,N. T., Tamaki, S., Kobayashi ,D., Gerfold, D., Stayton,M., Shen,H., Gold,S., Lorang,J., Thordal-Christensen,H., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B. (1990). Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 112-121
  38. Keen, N. T. (1988). Host range determinants in plant pathogens and synbionts. Annual Reviews Microbiology 42:421-440
  39. Kelemu, S. and Leach, J. E. (1989). Cloning and characterization of



- an avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 2, 59-65
40. Kim, J.F., Wei, Z.-M. and Beer, S. V. (1997). The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes Harpin. Jour. Bact. 1690-1697
41. Knoop, V., Staskawicz B. and Bonas, U. (1991). Expression of the Avirulence Gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. Journal of Bacteriology . 173, 7142-7150
42. Kobayashi, D., Tamaki, S. and Keen N. T. (1990). Molecular characterization of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3:94-102
43. Kobayashi, D. Y., Tamaki, S. J., and Keen, N. T. (1989). Cloned avirulence genes from the pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* confer cultivar specificity on soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 157-161.
44. Kobayashi, D. Y., Tamaki, S. J. Gold, S. and Keen, N.T. (1989). A gene from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* with homology to avirulence phenotype. Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 103-111
45. Laby, R. J. and Beer, S. V. (1990). The *hrp* gene cluster of *Erwinia amylovora* shares DNA homology with other bacteria (abstract; A650). Phytopathology 80, 1938-1939
46. Laby, R. J. and Beer, S. V. (1992). Hybridization and Functional complementation of the *hrp* gene cluster from *Erwinia amylovora* strain Ea321 with DNA of other bacteria Mol. Plant-Microbe Interact.



5, 421-419

47. Leite, R. P., Egel, D. S. and Stall, E. (1994). Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequence of *Xanthomonas campestris* strains causing disease of citrus  
Appl. Env. Microbiol. 1078-1086
48. Leite, R. P., Misavage, G. V., Bonas, U. and Stall, R. E. (1994). Detection and identification of amplification of DNA sequence related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.  
Appl. Env. Microb. 1068-1077
49. Li, T., Benson, S.A. and Hucheson, S.W. (1992). Phenotypic expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrm* gene cluster in *Escherichia coli* MC4100 requires a functional porin.  
Jour. Bacteriol. 1742-1749.
50. Lindgren, P. B., Frederick, R., Govindarajan, A. G., Panopolous, N. J., Staskawitz B. J. and Lindow, S. E. (1987). An ice nucleation reporter gene system: identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. EMBO. 5,
51. Lorang, J. M., Shen, H., Kobayashi, D., Cooksey, D. and Keen, N. T. (1994) *avrA* and *avrE* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23 Play Role in Virulence on Tomato Plants. Mol. Plant-Microb. interact. 4, 508- 515
52. Loubens, I., Richter, G., Mills, D. and Bohin, J-P. (1992). A Pathogenicity Gene of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* components a defect in periplasmic glucan biosynthesis in *E. coli* K-12. Palais des Congres~ Versailles France (Abstract).
53. Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F. (1989). Molecular



Cloning 2nd edition

54. Michels, T., Vanooteghem, J. C., D. E. Rouvroit, C. J. China, B., Gustine, A., Boudry P. and Cornelis G.R. (1991). Analysis of virC an Operon Involved in the Secretion of Yop Proteins by *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. 4994-5009
55. Misavage, G. V., Dahlbeck, D., Wahlen, M. C., Kealney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J. and Stall R. E. (1990). Gene-for-Gene Relationships Specifying Disease Resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-Pepper Interaction. Mol. Plant-Microbe Interact. 1, 41-47
56. Plano. G. V. , Brave, S. S. and Straley S. C. (1991). LcrD, a Membran-bound Regulator of the *Yersinia pestis* Low-calcium Response. Jour. Bacteriology. vol.173, No.22, 7293-7303
57. Rahme, L. G., Mindrons, M. N. and Panopoulos, N. J. (1991). Genetic and Transcriptional Organization of the *hrp* cluster *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. J. Bacteriol. 575-586
58. Ramakrisman, G., Zarg, J. and Newton, A. (1991). The Cell Cycle-Regulated Flagellar Gene *flbF* of *Caulobacter crescentus* Is Homologous to Virulence locus\*(*lcrD*). of *Yersinia Pestis* Jour. Bacteriol. 22, 7283-7292.
59. Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiho-Lassia, E.-L., Kalkkinen, N., Romantscuk, M. and He, S. H. (1997). Hrp pilus: An hrp-dependant bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 94, 3459-3464
60. Ryals, J.A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H-Y. and Hunt, M. D. 1996 Systemic Acquired Resistance



The Plant Cell. 8, 1809-1819

61. Salmeron, J. M. and Staakawicz B. J. (1993). Molecular characterization and *hrp* dependance of the avirulence gene *avrPro* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Mol. Gen. Genet. 239, 6-16
62. Salmond, G. P. C., (1994). Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 32. 181-200
63. Sanger, F., Nicklens, S. and Coulson, A.R. 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 1342-1346
64. Scholz, B. K., Jakobek, J. L. and Lindgren P. B. (1994). Restriction Fragment Length Polymorphism Evidence for Genetic Homology within a Pathovar of *Pseudomonas syringae*. Appl. Env. Microb. 1093-1100
65. Schulte, R. and Bonas, U. (1992). Expression *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible J. Bacteriol. 815-823
66. Simon, R., Prifer, U. and Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechnology
67. Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. T. and Napoli C. (1987) Molecular Characterization of Cloned Avirulence genes from Race0 and Race1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J. Bacteriol. 5789-5794
68. Staskawicz, B., Daulbeck, D., Keen, N. T. and Napoli, C. (1987).



- Molecular characterization of cloned avirulence genes from race0 and race1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J. Bacteriol. 5789-5794
69. Staskawicz, B., Daulbeck, D. and Keen N. T. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycinemax (L.). Merr. Proc. Nat I. Acad. Sci. USA.
70. Swanson, J., Kealney, B., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B. (1988). Cloned avirulence Gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants Mol. Plant-Microbe Interact. 1, 5-9
71. Swarup, S., Feyter, R. D., Bransky, R. H. and Gabriel, D. W. (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enable strains from several pathovars of elicit canker like lesion on citrus. Phytopathol. 7. 802-809.
72. Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T. and Gabriel, D. W. (1992). An *Xanthomonas citri* pathogenicity Gene *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhost. Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 204-213
73. Van Gijsegem F, Gough C, Zischek C, Niqueux E, Arlat M, Genin S, Barberis P, German S, Castello P, Boucher C. (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. Mol. Microbiol. 15, 1095-1114
74. Tsuyumu, S., Takikawa, Y., Furutani, N., Tanaka, K., Kanamori, H.,



- Kondou, Y. and Nagai, H. 1996 Factors Involved in the Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* molecular aspects of pathogenicity and resistance APS Press: 105-114
75. Tu, J., Wang, H. R., Chang, S. F., Charng, Y. C., Lurz, R., D. B. and Wu, W. C. (1989). Transposable elements of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* originating from indigenous plasmids Mol. Gen. Genet. 217, 505-510
76. Turner, P., Barbar, C. and Daniers M., (1985). Evidence for clustered Pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Gen. Genet. 199, 338-343
77. van den Mooter, M. and Swings, J. (1990). Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. Int. Jour. Syst. bacteriol. 348-369
78. Verterin, L., Yang, P., Hoste, B., Vancanneyt, M., Civerolo, E. L., Swings, J. and Kersters, K. (1991). Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Strains by Fatty Acid Analysis, and DNA-DNA Hybridization Int. Journal of Systematic bacteriology. 535-542
79. Waney, V. R., Kingsley, M. T. and Gabriel, D. W. (1991). *Xanthomonas campestris* pv. *translucence* genes determining host specific virulence on Cereals Identified by Tn5-gusA insertion mutagenesis. Mol. Plant-Microbe Interact. 4, 623-627
80. Wei, Z-M., Sneath, B. J. and Beer S. V. (1992). Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. J. Bacteriol. 6, 1875-82.
81. Wei, Z-M. and Beer, S. V. (1990). Functional homology between A locus of *Escherichia coli* and the *hrp* gene cluster of *Erwinia*



- amylovora* (Abstract:A652). *Phytopathology*, 10, 1039
82. Wengelnik, K., Ackerveken, G. V. and Bonas, U. (1996). HrpG, a Key hrp Regulatory Protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Is Homologous to Two-component Response Regulators *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 704-712
  83. Wengelnik, K., and Bonas, U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of six loci in the *hrp* Cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Jour. Bacteriol.* 3462-3469
  84. Willis, D. K., Rich, J. J. and Hrabak E. M. (1991). *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2, 132-138
  85. Wirth, R., Friesenegger A. and Fierder S. (1989). Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation *Molecular General Genetics* 216:175-177
  86. Xiao, Y., Lu, Y., Heu S. and Hutcheson, S. W. (1992). Organization and Environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 hrp Cluster *Jour. Bacteriol.* 1734-1741
  87. Yang, Y., and Gabriel, D. W. (1995). *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8.627-631
  88. Yang, Y. and Gabriel, D.W. (1995). Intragenic Recombination of a Single Plant Pathogen Gene Provides a Mechanism for the evolution of New Host Specificities. *J. Bacteriol.* 17, 4963-4968
  89. Yang, Y., Feiter, R. D. and Gabriel, D. W. (1994). Host-specific Symptoms and Increased Release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of *pthA* and *avrb6*, respectively. *Mol.*



Plant-Microbe Interact. 7, 345-355

90. Yang, Y., Yuan, Q. and Gabriel, D. W. (1996). Watersoaking function(s). of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* Gene Family. Mol. Plant-Microbe Interact. 2, 225-237
91. Yuan, J. and He, S. Y. (1996). The *Pseudomonas syringae* Hrp regulation and secretion system controls the protection and secretion of multiple extracellular proteins. Jour. Bacteriol. 6399-6402
92. Yucel, I., Slaymaker, D., Boyd, C., Murillo, J. R., Buzzell, I. and Keen, N. T. (1994). Avirulence Gene *avrFphC* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 3121: A Plasmid-borne Homologue of *avrC* closely linked to an *avrD* allele. Mol. Plant-Microbe Interact. 5, 677-679
93. Yucel, I., and Keen, N. T. (1993). Amino acid residues required for the activity of *avrD* alleles. Mol Plant-Microbe Interact. 1, 140-147



Table 1. 本研究における供試菌株および plasmid

供試菌株および plasmid	特徴
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	
L-9	カンキツかいよう病菌の野性株 Nal <sup>r</sup>
NA-1	カンキツかいよう病菌の野性株
F-1~10	Tn5挿入によるカンキツかいよう病菌(L-9)の病原性欠損変異株
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	
HJ39	ピーマンより分離 This study
MAFF 03-01256	トマトより分離 This study
<i>Escherichia coli</i>	
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , endA1, hsdR17(rk <sup>+</sup> mk <sup>-</sup> ), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169
Plasmids	
pXCF13-38	<i>X. c. pv. citri</i> の hrp 領域を含む 24.7kb の断片を持つ This study コスミドクローン(vector:pLAFR5)。 Tet <sup>r</sup>
pXCF13-44	<i>X. c. pv. citri</i> の hrp 領域を含む 25kb の断片を持つ This study コスミドクローン(vector:pLAFR5)。 Tet <sup>r</sup>
pLAFR5	IncP, mob, Tet <sup>r</sup> , cosmid vector
pRK2013	IncP, Tra, RK2+, $\Delta$ repRK2, repE1+, Km <sup>r</sup> helper plasmid used for triparental mating
pLAFR3	IncP, cos, rlx, tet <sup>r</sup> , cosmid vector
pHSG298	pMB1, lacZ, Km <sup>r</sup>
pBluescript	
Spice-Tn3	inaZ, Ap <sup>r</sup> , Sp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup>
pShee	tnpA, pACYC replicon, Cm <sup>r</sup>
pNK1	<i>X. c. pv. citri</i> の apl3 領域を含む 25kb の断片を持つ コスミドクローン(vector:pLAFR3)。
pNK2	<i>X. c. pv. citri</i> の apl2 と apl3 領域を含む 25kb の断片を持つコスミドクローン(vector:pLAFR3)。
pNK6	<i>X. c. pv. citri</i> の apl2 領域を含む 25kb の断片を持つ コスミドクローン(vector:pLAFR3)。



- pNK17 *X. c. pv. citri* の *apl1* 領域を含む 25kb の断片を持つ  
コスミドクローン(vector:pLAFR3)。
- pNKHE1 約 6kb の *EcoRI* 断片を pHSG298 につなげたもの。  
*apl3* 領域を有する。
- pNKHE2 約 13kb の *EcoRI* 断片を pHSG298 につなげたもの。  
*apl2* 領域を有する。
- pNKBH1 約 5.5kb の *Hind III* 断片を pBluescript につなげたもの。  
*apl1* 領域を有する。
- pHIR11 *P. s. pv. syringae* の *hrp* 領域を含む 30kb の断片を持つ  
コスミドクローン(vector:pLAFR3)。

#### RFLP 解析に供試した菌株

##### *Xanthomonas campestris*

- pv. alfalfae* MAFF 301090
- pv. begoniae* Xbeg8101
- pv. campestris* XC8712, XCC4
- pv. cannabis* MAFF 301606, MAFF 301607
- pv. carotae* MAFF 301101, MAFF 301111
- pv. citri* citrus802, L3, L-9, N1, NA-1, OM, 廿2-1, 廿2-2, IV-1, T-1,
- pv. glycines* TMR196, TMR200, TMR201, TMR496
- pv. physalidicola* MAFF 301206
- pv. pruni* MAFF 301421, MAFF 301424, XPR8901
- pv. vesicatoria* MAFF 301256, MAFF 301262, HJ39 (Isolated from  
pepper) TOMXV8901 (Isolated from tomato)
- pv. vitians* lettuce80-1, MAFF 301352, MAFF 301771
- pv. zantedeschiae* MAFF 301639, MAFF 301640

##### *Xanthomonas oryzae*

- pv. oryzae* T7147 (race2), H75373(race4)

##### non-pathogenic *Xanthomonas* spp.

Xcall (Isolated from carrot.), Xcar6 (Isolated from carrot.), lettuce79-2 (Isolated from lettuce),  
lettuce79-4 (Isolated from lettuce.), DAIZU-X8103 (Isolated from soybean.), KUZU-3by (Isolated  
from kudzu vine.), XCANNAG (Isolated from hemp.), XMG8101 (Isolated from lily magnolia.)

---



Table. 2 *Xanthomonas*属細菌におけるElectroporation法による形質転換効率

菌株	クローン	コロニー数	転換効率
Non-pathogenic <i>Xanthomonas</i> strains			
Xcar1	pNK17	336	$1.68 \times 10^{-4}$
lettuce79-4	pNK17	254	$1.27 \times 10^{-4}$
<i>X. c. pv. citri</i>			
F-2	pNK2	6416	$3.21 \times 10^{-3}$
F-2	pNK17	1564	$0.78 \times 10^{-3}$
F-4	pNK1	3132	$1.57 \times 10^{-3}$
F-4	pNK2	251	$1.26 \times 10^{-4}$
F-4	pNK6	34	$1.70 \times 10^{-5}$
F-4	pNK1	7573	$3.79 \times 10^{-3}$
F-5	pNK2	3968	$1.98 \times 10^{-3}$
F-7	pNK2	249	$1.25 \times 10^{-4}$
F-8	pNK2	200	$1.00 \times 10^{-5}$
F-8	pNK17	2256	$1.13 \times 10^{-3}$
F-10	pNK2	460	$2.30 \times 10^{-4}$
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>			
TOMXV8901	pNK17	58	$2.90 \times 10^{-5}$
HJ39	pNK17	81	$4.05 \times 10^{-5}$
MAFF 03-01356	pNK17	240	$1.20 \times 10^{-4}$



Table 3 *apl* 遺伝子を導入した病原性欠損変異株のカンキツ葉への接種

	F-2	F-4
pNK17( <i>apl1</i> )	+(5~7 日)	+(5~7 日)
pNK6( <i>apl2</i> )	+(14~21 日)	+(14~21 日)
pNK1( <i>apl3</i> )	-(60 日以上)	-(60 日以上)
pNK2( <i>apl2</i> and <i>apl3</i> )	+(14~21 日)	+(14~21 日)



Table. 4 apl1 導入による形質転換 *Xanthomonas* 属菌株の接種結果

細胞肥大が見られたもの	細胞肥大が見られなかったもの
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i>
F-1 ~ F-4	F-5, F-7
F-8 ~ F-10	NH38-15 ( <i>hrp</i> <sup>-</sup> )
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	NH44-15 ( <i>hrp</i> <sup>-</sup> )
HJ39	non-pathogenic <i>Xanthomonas</i>
MAFF03-01256	lettuce79-2
	lettuce79-4



Table.5 *apl* 遺伝子および *hrp* 遺伝子を導入した大腸菌の接種結果

	pHIR11( <i>hrp</i> )なし	pHIR11( <i>hrp</i> )あり
DH 5 $\alpha$	-	-
pHSG298	-	-
pBluescript	-	-
pNKBH1( <i>apl1</i> )	-	+
pNKHE2( <i>apl2</i> )	-	-
pNKHE1( <i>apl3</i> )	-	-
pNKBH1( <i>apl1</i> ) and pNKHE2( <i>apl2</i> )	-	++

供試植物 ナツダイダイ  
 供試菌株 DH 5  $\alpha$



Table.6 PthA, Apl1, Apl2 and Apl3.の繰り返し領域におけるアミノ酸配列の比較

No. <sup>a)</sup>	var.block1 <sup>b)</sup>				var.block2 <sup>c)</sup>			
	PthA	Apl1	Apl2	Apl3	PthA	Apl1	Apl2	Apl3
1	PE	PE	PE	PE	SNI	SNI	SNI	SNI
2	PE	PE	PE	PE	SN-	SN-	SN-	SHG
3	PE	PE	PE	PE	SNI	SNI	SNI	SNI
4	PE	PE	PE	PE	SNI	SNI	SHD	SHD
5	PA	PA	PE	PE	SNI	SNI	SNI	SHD
6	PE	PE	PE	PE	SNG	SHD	SHD	SHD
7	PD	PE	PD	PD	SHD	SHD	SHD	SHD
8	PQ	PE	PQ	PQ	SNG	SNG	SNG	SNG
9	PE	PE	PE	PE	SHD	SHD	SHD	SHD
10	PE	PE	PE	PE	SNG	SNG	SNG	SHD
11	PE	PE	PE	PE	SNG	SNG	SNG	SN-
12	PE	PE	PE	PA	SNG	SNG	SNG	SNI
13	LD	LD	LD	PE	SNG	SNG	SNG	SHD
14	PE	PE	PE	PE	SNS	SNS	SNI	SHD
15	PD	PD	PE	PE	SHD	SHD	SHD	SNI
16	PE	PE	PE	PE	SHD	SHD	SNG	SHD
17	PE	PE		PD	CNG	CNG		SHD
18	PE	PE		PE	SNG	SNG		SNG
19				PE				SHG
20				PE				SNG
21				PE				SNI
22				PE				SHG
23				PE				CNG
24				PE				SNG

a) No. ;繰り返しユニットの位置

b) Variable block1 ;3、4番目のアミノ酸

c) Variable block2 ;11、12、13番目のアミノ酸.



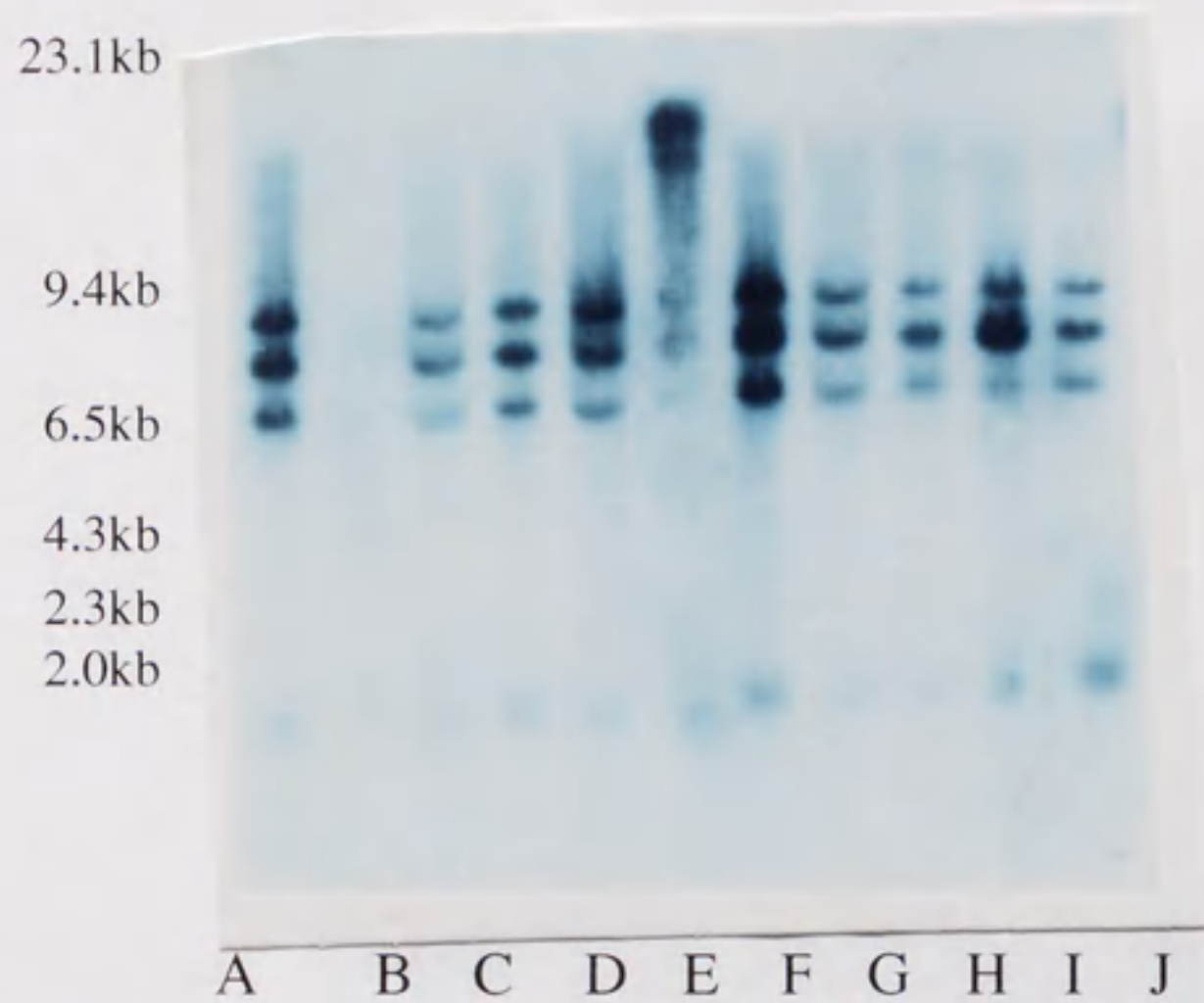


Fig. 1 カンキツかいよう病菌のRFLP

A; L-9, B; T-1, C; IV-1, D; 廿2-2, E; 廿2-1, F; OM, G; NA-1, H; N1, I; L3, J; citrus802, probe; pXCF13-38, enzyme; EcoR I

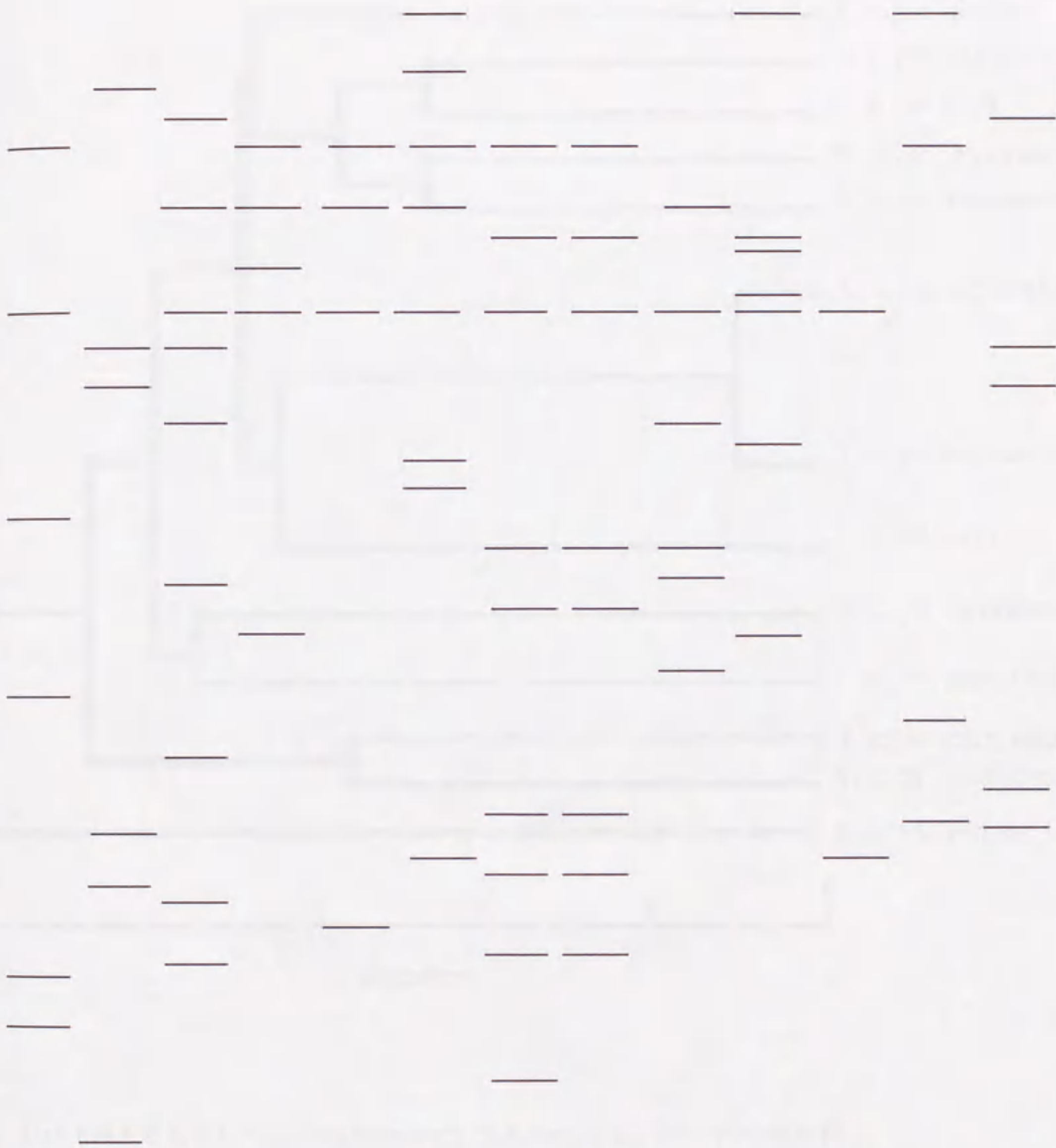




Fig. 2 非病原性*Xanthomonas*属細菌のRFLP

A; Xcal1 (Isolated from carrot.), B; Xcar6 (Isolated from carrot.), C; lettuce79-2 (Isolated from lettuce), D; lettuce79-4 (Isolated from lettuce.), E; DAIZU-X8103 (Isolated from soybean.), F; KUZU-3by (Isolated from kudzu vine.), G; XCANNAG (Isolated from hemp.), H; XMG8101 (Isolated from lily magnolia.) probe;pXCF13-38, enzyme;*EcoR* I





Alf Cam Can Car Cit Gly Ory II Ory IV Phy Pru Ves Vit Zan

Fig.3 *Xanthomonas campestris* pathovarsの R F L P

Alf; *X. c.* pv. *alfalfae*, Cam; *X. c.* pv. *campestris*, Can; *X. c.* pv. *cannabis*, Car; *X. c.* pv. *carotae*, Cit; *X. c.* pv. *citri*, Gly; *X. c.* pv. *glycines*, Ory II; *X. o.* pv. *oryzae* race II, Ory IV; *X. o.* pv. *oryzae* race IV, Phy *X. c.* pv. *physaridicola*, Pru; *X. c.* pv. *pruni*, Ves; *X. c.* pv. *vesicatoria*, Vit; *X. c.* pv. *vitians*, Zan; *X. c.* pv. *zantedeschiae*; probe; pXCF13-38, enzyme; EcoR I



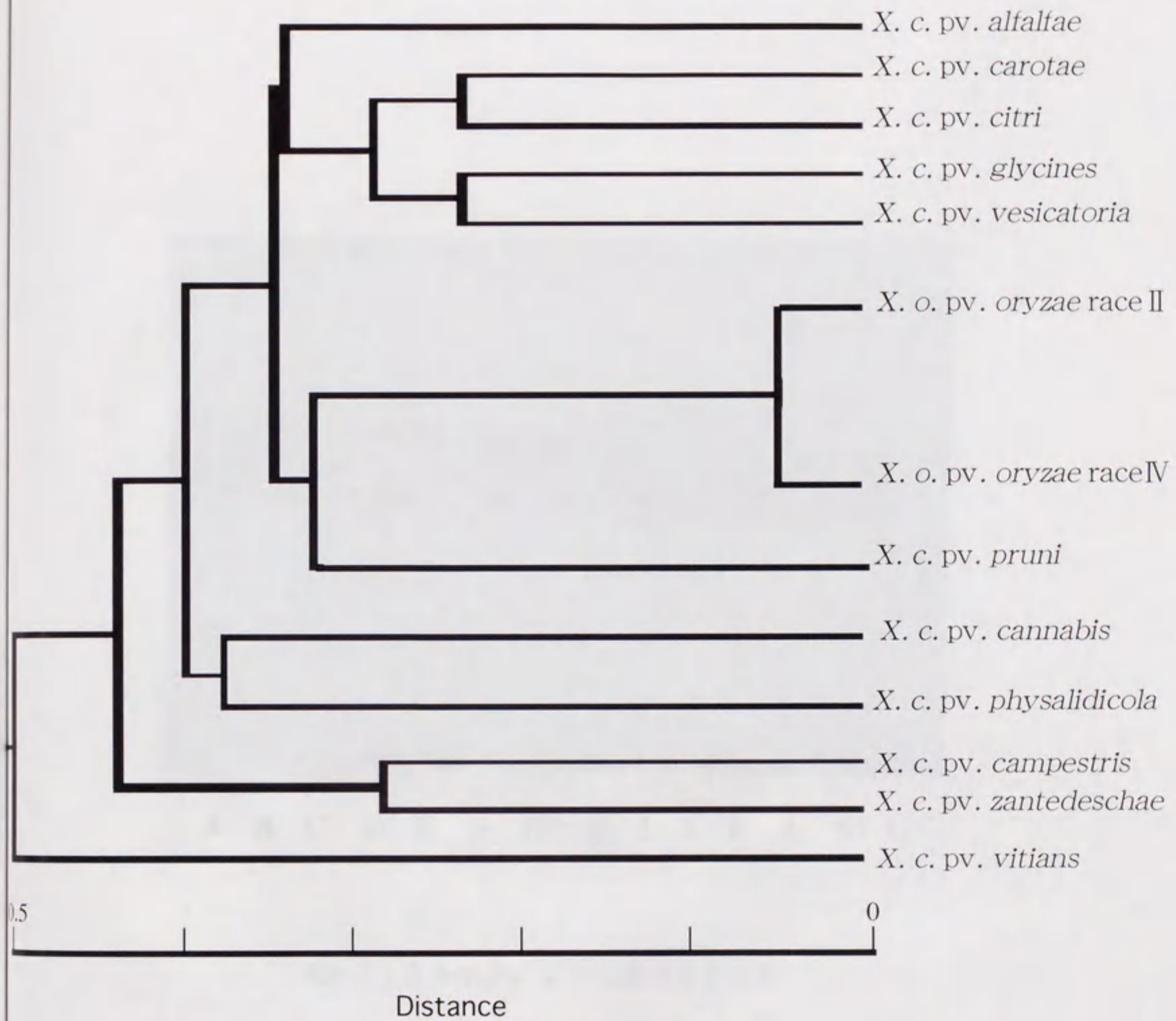
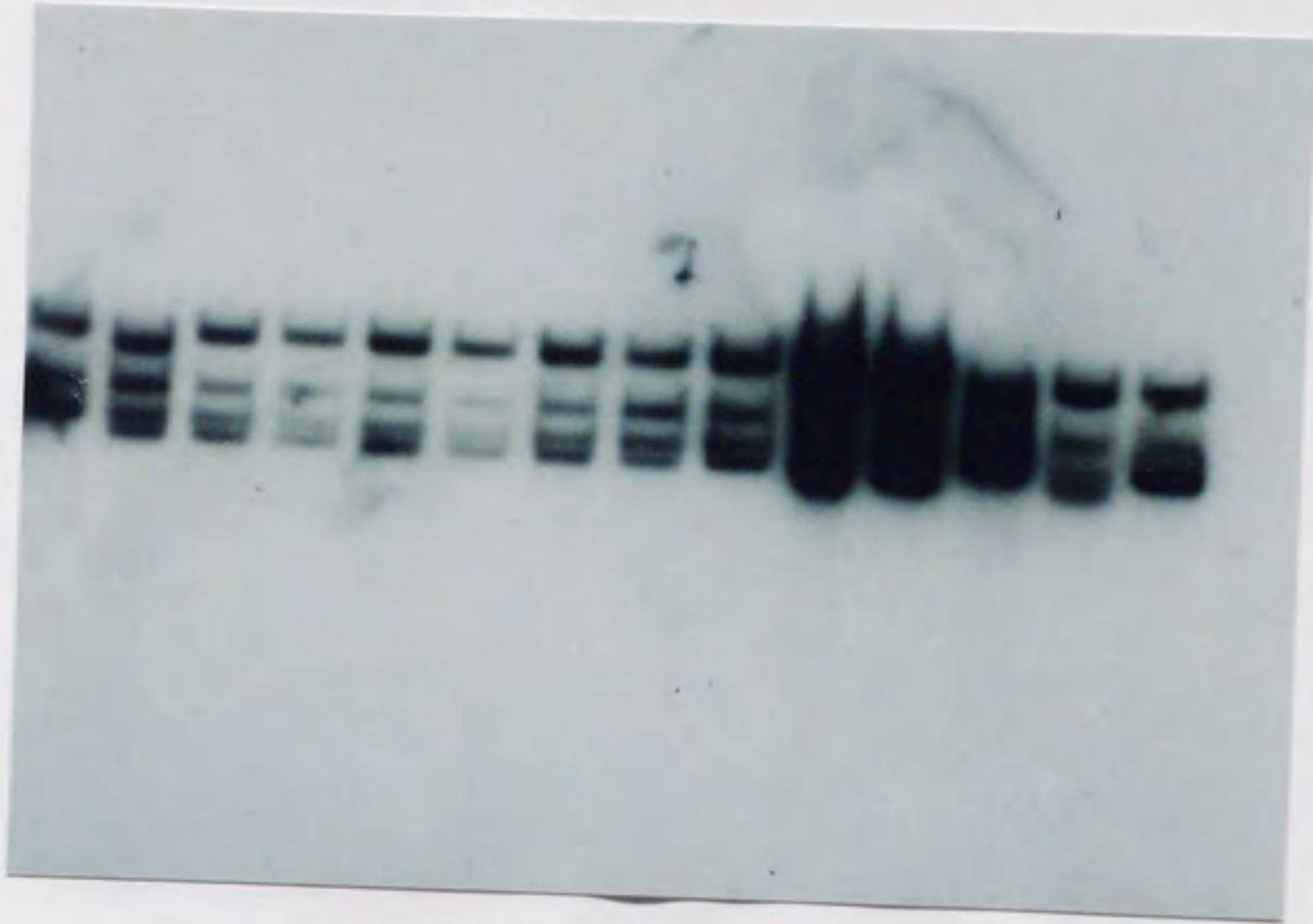


Fig4 RFLPをもとにした*Xanthomonas campestris* pathovarsの樹形図

probe;pXCF13-38  
enzyme;EcoR I



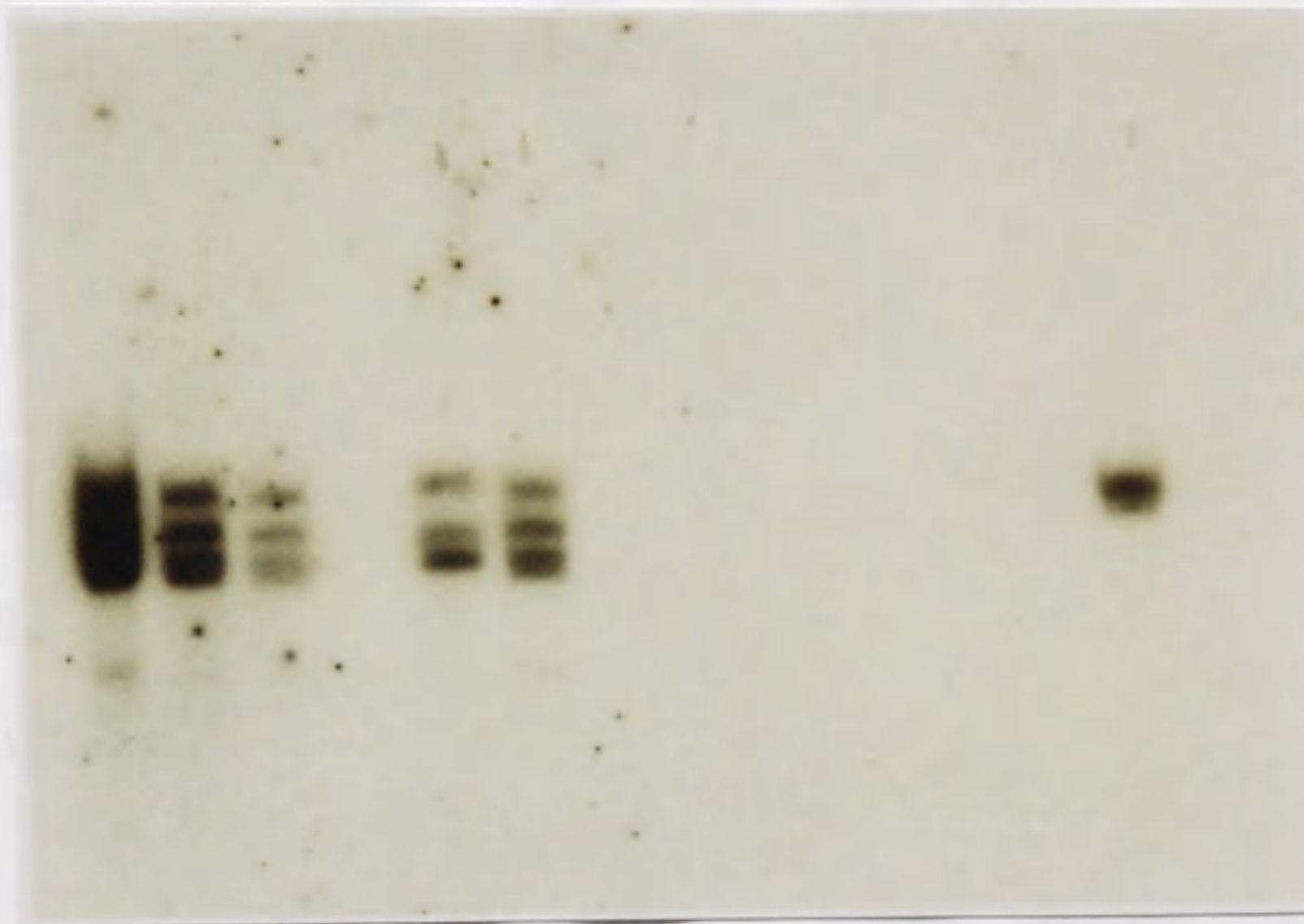


A B C D E F G H I J K L M N

Fig. 5 カンキツかいよう病菌のRFLP

A; L-9, B; T-1, C; T-2, D; T-3, E; IV-1, F; IV-2, G; 廿2-1, H; 廿2-2,  
 I; 廿2-3, J; OM, K; NA-1, L; N1, M; L3, N; citrus802,  
 probe; RU2, enzyme; EcoR I





NA-1

L-9

Car6

Fig. 6 非病原性 *Xanthomonas* 属細菌の RFLP

Enzyme; *EcoRI*, probe; RU2 and Tn5



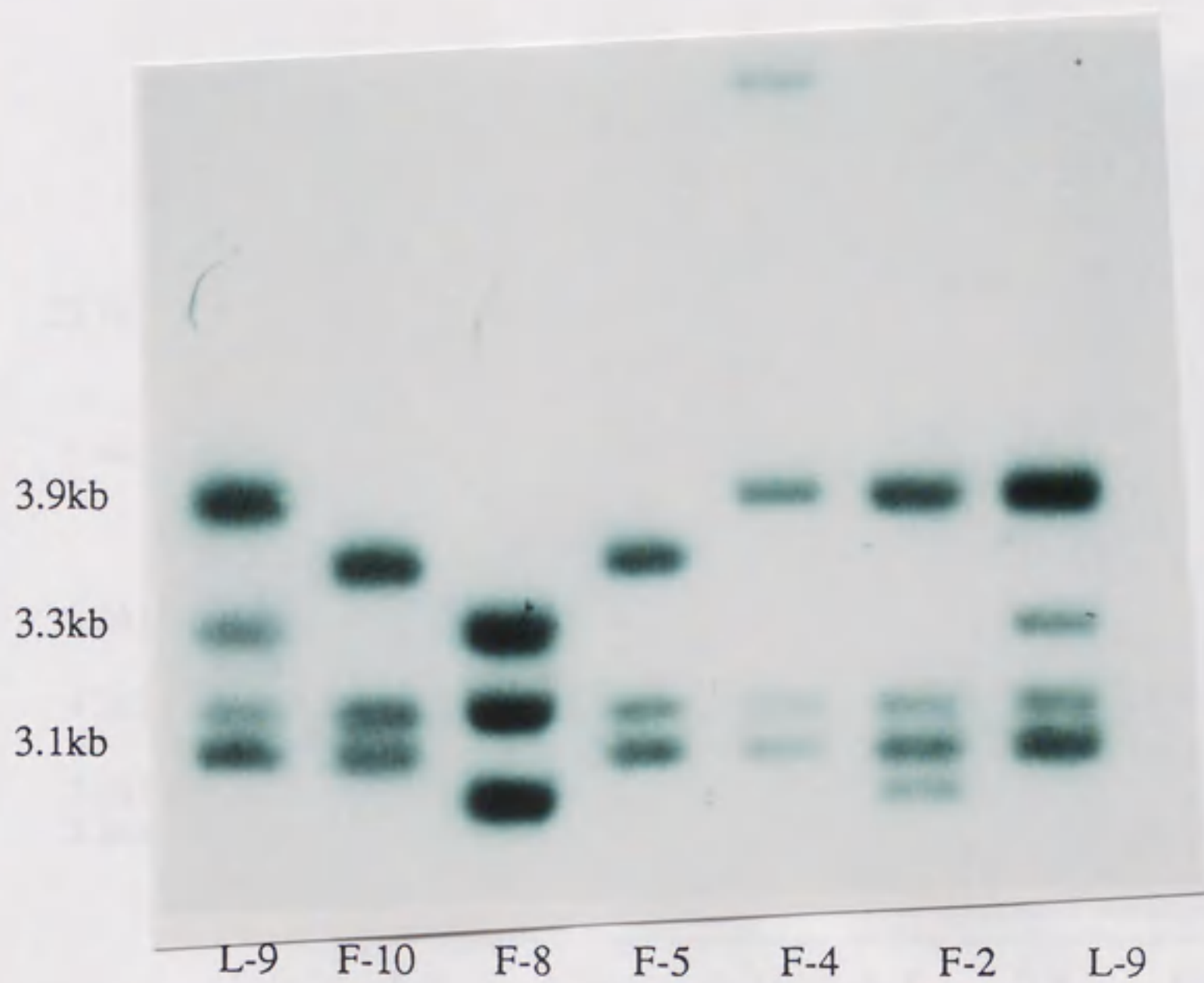


Fig. 7 病原性欠損変異株におけるサザンハイブリダイゼーション

Enzyme; *Bam*H I , probe; RU2



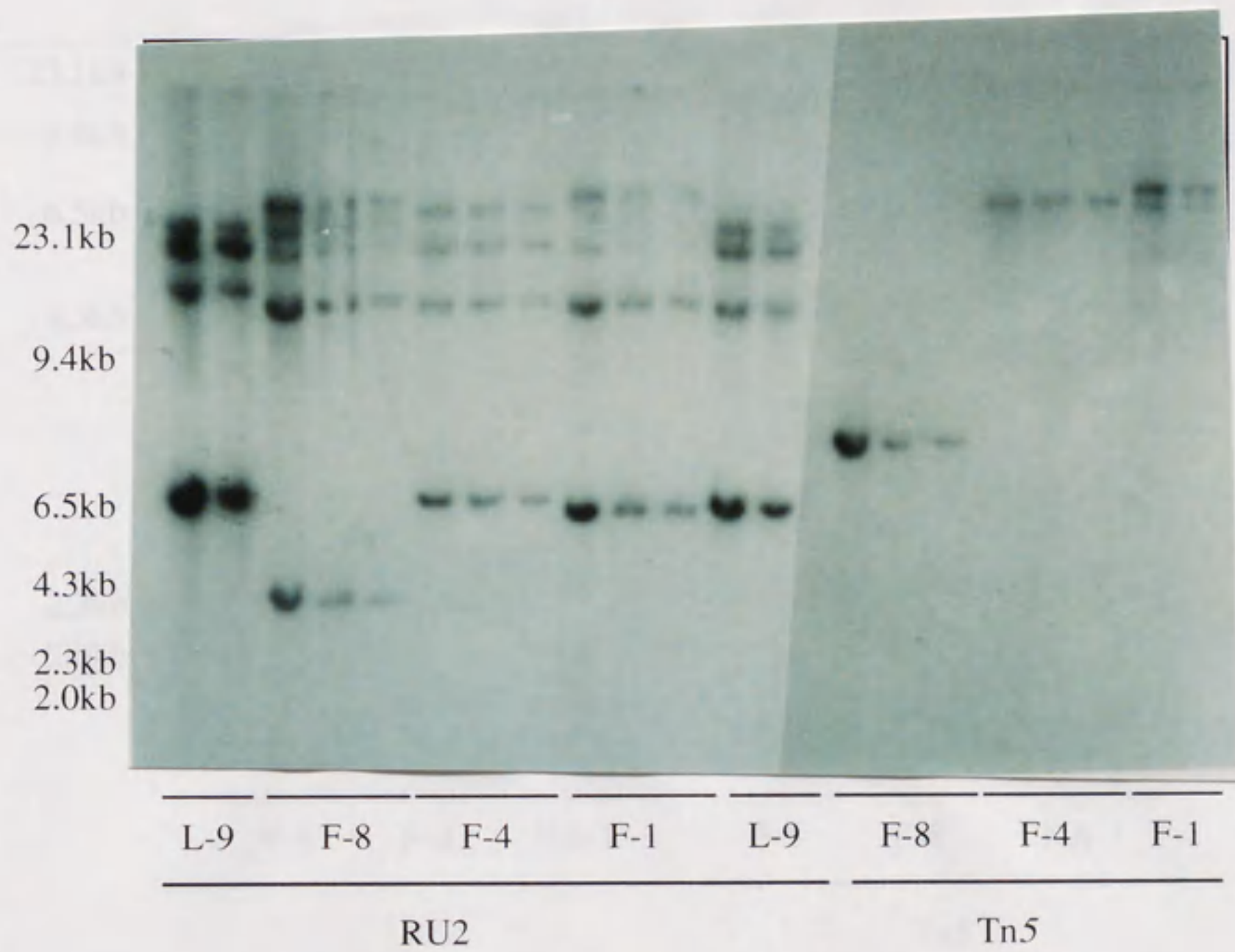


Fig. 8-1 病原性欠損変異株におけるサザンハイブリダイゼーション

Enzyme; *EcoR* I, probe; RU2 and Tn5



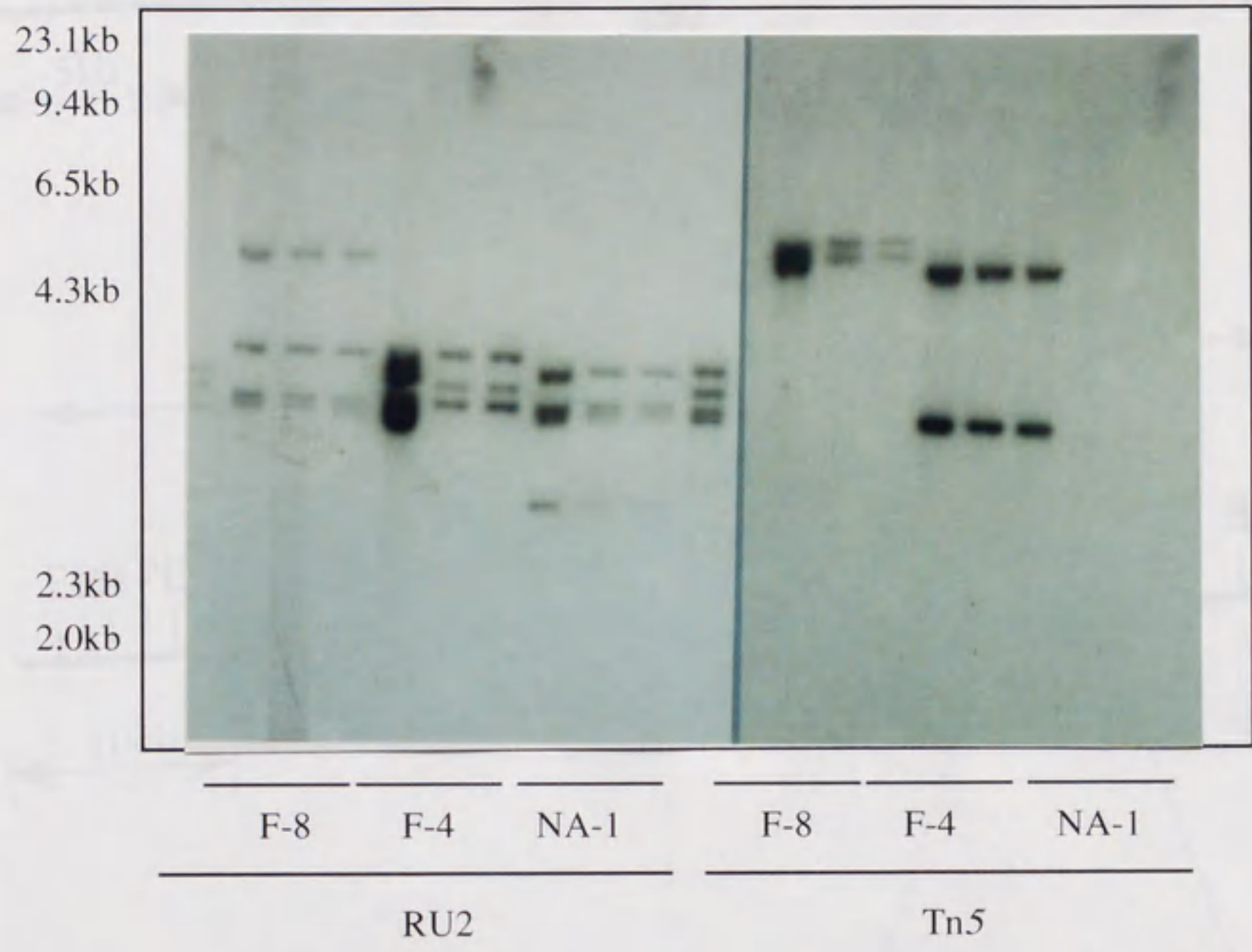


Fig. 8-2 病原性欠損変異株におけるサザンハイブリダイゼーション

Enzyme; *Bam*H I , probe; RU2 and Tn5



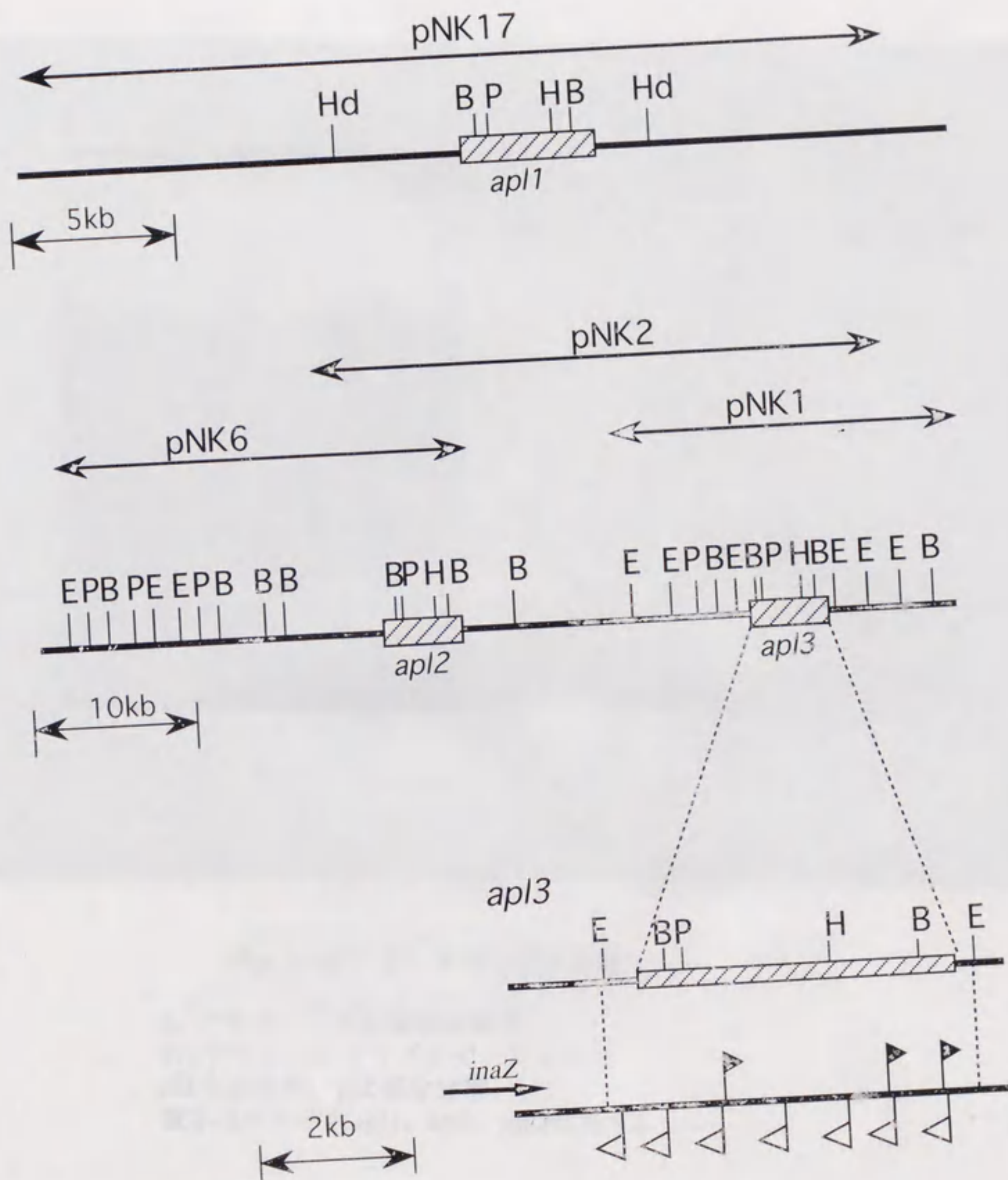


Fig. 9 *apl1*, *apl2*, *apl3*の周辺領域の制限酵素地図

矢印は各領域をカバーするコスミドクローン  
*apl3*において；  
 黒三角は *inaZ*での転写が見られたもの。  
 白三角は *naZ*での転写が見られなかったもの。  
 矢印は転写方向を示す



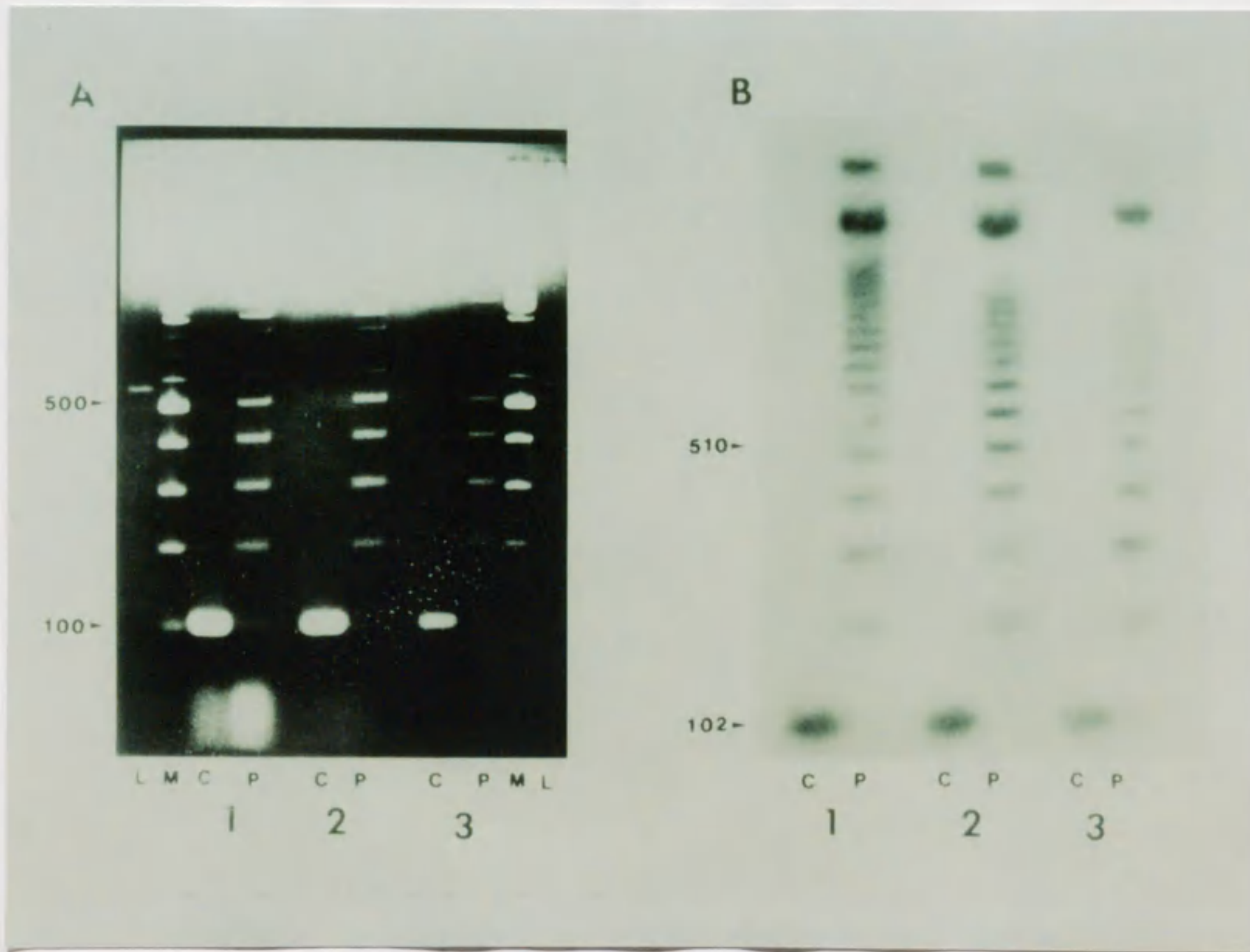


Fig. 10 繰り返し領域の部分分解

A; アガロースゲル電気泳動法  
 B; サザンハイブリダイゼーション  
 cは完全分解、pは部分分解  
 数字はそれぞれapl1、apl2、apl3を表す。



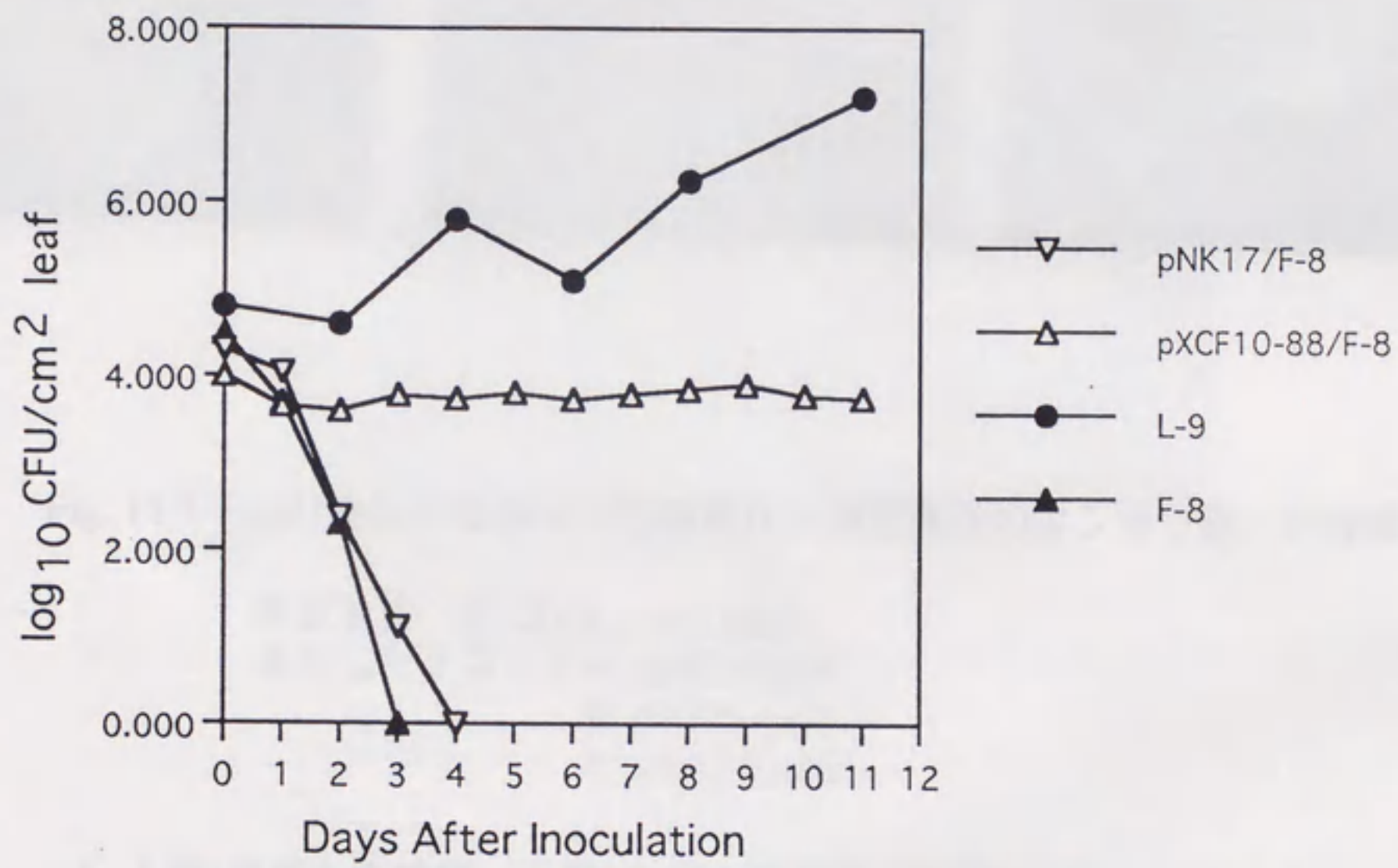


Fig. 11 時間経過に伴う菌数の変化



A

B

C



Fig. 12-1 *apl1*遺伝子を導入した病原性欠損変異株のカンキツ葉への接種

供試菌株 F-2 (*X. c. pv. citri*)  
 導入したクローンA; pNK1(*apl3*)  
 B; pNK6(*apl2*)  
 C; pNK17(*apl1*)

- A. 上部2カ所；野性株、右側2カ所；変異株、左側2カ所；形質転換体  
 B. 上部2カ所；野性株、右側2カ所；形質転換体、左側2カ所；変異株  
 C. 上部2カ所；野性株、右側2カ所；形質転換体、左側2カ所；変異株





Fig. 12-2 *aplI*遺伝子を導入したXanthomonas属菌のカンキツ葉への接種

供試菌株 HJ39(*X. c. pv. vesicatoria*)

MAFF03-01256(*X. c. pv. vesicatoria*)

導入したクローン pNK17(*aplI*)

右上；MAFF03-01256野性株

右下；MAFF03-01256形質転換体

左上；HJ39野性株

左下；HJ39形質転換体





Fig. 12-3 *apl1*遺伝子を導入した*E.coli*のカンキツ葉への接種

供試菌株 DH5  $\alpha$

導入したクローン pNKBH1(*apl1*)

pNKHE1(*apl2*)

pHIR11(*hrp*)

左上 ; DH5  $\alpha$  (*E.coli*)

右上 ; pHIR11(*hrp*)/DH5  $\alpha$

左下 ; pNKBH1(*apl1*)+pHIR11(*hrp*)/DH5  $\alpha$

右下 ; pNKBH1(*apl1*)+pNKHE1(*apl2*)pHIR11(*hrp*)/DH5  $\alpha$



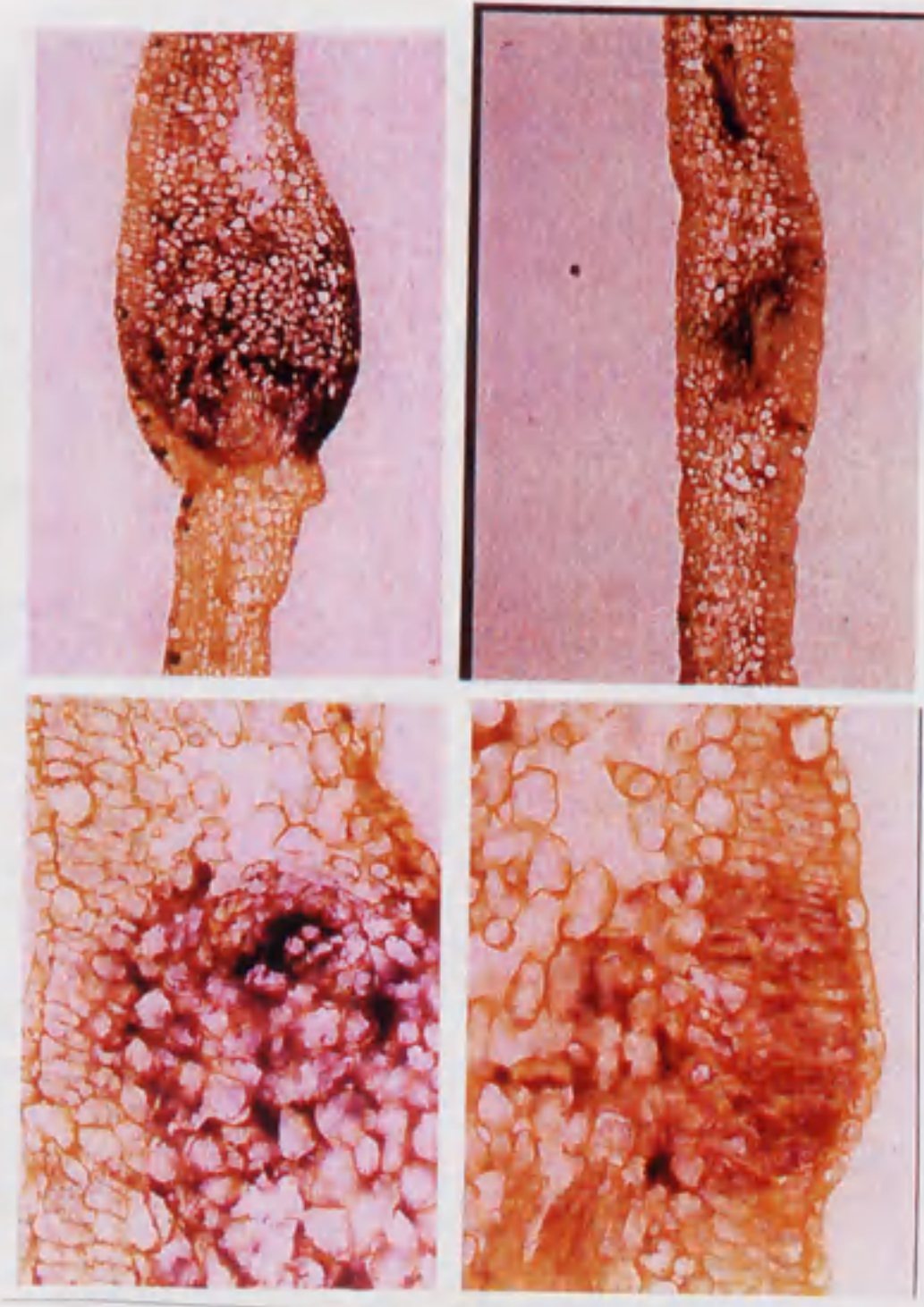


Fig. 13-1 *apl1*遺伝子を導入した*Xanthomonas*属菌のカンキツ葉への接種  
(光学顕微鏡による組織の観察)

供試菌株 HJ39(*X. c. pv. vesicatoria*)

MAFF03-01256(*X. c. pv. vesicatoria*)

導入したクローン pNK17(*apl1*)

右上; 全体図(MAFF03-01256)

右下; 拡大図(MAFF03-01256)

左上; 全体図(HJ39)

左下; 拡大図(HJ39)



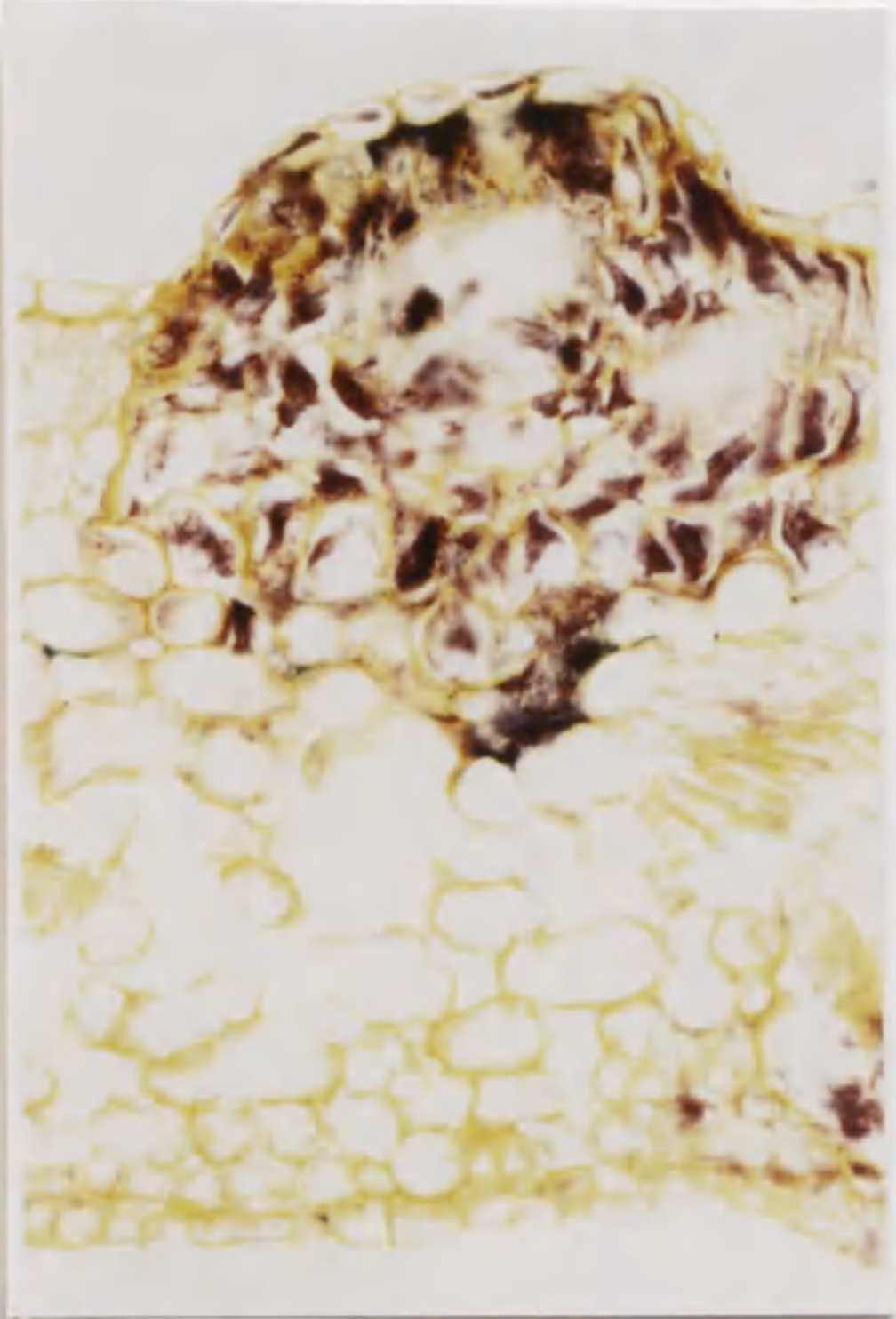


Fig. 13-2 *apl1*遺伝子を導入した*Xanthomonas*属菌のカンキツ葉への接種  
(光学顕微鏡による組織の観察)

供試菌株 DH5 $\alpha$

導入したクローン pNKBH1(*apl1*)、pNKHE2(*apl2*)

pHIR11(*hrp*)

右；全体図、左；拡大図



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 ap11 TCTGTTCGGC CAAGCGCCGC CGGTACACAG TCTCAACCTT GTAGAGCTTC CCGCGCGGGA GTTTATGGAT GGTGTCCCG TCGACGGGT AGCAGGAGAT  
 ap12 GACAACCAGC TCAACCTTGA ACCAAGCGTC TTCAGACATG GCACGCTACT CCGCCATCAT AGGAATGCCG CCGAATCAC GCTCTTCGTT AAGCCAATCT  
 ap13 CGGCCAATTC CCAGATCCAC GCTGGCCGGG CGCAAGAAGG TGATCGACCC GGAACCGGGG GAACCCGTGT CAAAAGCCGC GCTGCCAAG CGCAAGAAA

ap11 GAGGGTCGGC AGGGATTGGT GTAAAAACA GCCAAAAGTG AGCTAACTCG CTGTGAGCAC AGAAATTTT CACACCTTC TGCCGATCCT CCATGCGGGT  
 TLR(15)

ap11 CCGTGATCGC CTTATGTCT GCGCCTCACC CTGGTCGTCG AGGGTTGCCA GGATCACCCG AAGTTGTGTA CTGCCATGGC GCCTCGGAAG CTATGTAGGA  
 -35 -10

ap11 ACCACAGACC GCTAGTCTGG AGGCGACCAT GTAAAGAGGT ATGCGTATG GATCCCATTC GTTCGGCAC ACCAAGTCTT GCCCGCGAGC TTGTGCCCGG  
 SD initial codon

ap11 ACCCCAACCC GATGGGGTTC AGCCGACTGC AGATCGTGGG GTGTCTCCGC CTGCCGGCGG CCCCCTGGAT GGCTTGCCCG CTGGCGGAC GATGTCCCGG

ap11 ACCCGGCTGC CATCTCCCC TGCCCTCA CTTGGTTCT CGGCGGGCAG CTTCACTGAC CTGTTACGTC AGTTGATCC GTCACTTTTT AATACATCGC

ap11 TTTTGTATC ATTGCTCCC TTCGGGCTC ACCATACAGA GGCTGCCACA GCGAGTGGG ATGAGGTGCA ATCGGGTCTG CCGGCAGCCG ACGCCCCCCC

ap11 ACCCACCATG CGCGTGGCTG TCACTGCGGC GCGGCCCGG CGGCCAAGC CCGCGCCCG AGCAGTGTCT GCGCAACCTT CCGACGTTT GCGCGCCGCG

ap11 CAGGTGGATC TACGCAGCT CGGCTACAGC CAGCAGCAAC AGGAGAAGAT CAAACCGAAG GTTCGTTGCA CAGTGGCGCA GCACCAGAG GCACTGGTCC

ap11 GCCATGGTT TACACACCG CACATCGTTG CGCTCAGCCA ACACCCGGCA GCGTTAGGGA CCGTCGCTGT CAAGTATCAG GACATGATCG CAGCGTTGCC

ap11 AGAGGCGACA CACGAAGCGA TCGTTGGCGT CGGCAACAG TGTCCGGCG CACCGCCCTT GGAGGCCTTG CTCACGGTGG CCGGAGAGTT GAGAGTCCA

ap11 CCGTTACAGT TGGACACAGG CCAACTTCTC AAGATTGCAA AACGTGGCGG CGTGACCACA GTGGAGGCG TGCATGCATG GCGCAATGCA CTGACGGGTG

ap11 CCCCCCTGAA CTGACCCCG GAGCAGGTGG TGGCCATCGC CAGCAATATT GGTGGCAAGC AGGCGCTGGA GACGGTGCAG CCGCTGTTGC CCGTGTCTGTG  
 ← start of repeating region

ap11 CCAGGCCCAT GGCTGACCC CGGAGCAGGT GGTGGCCATC GCCAG---CAATG GCGGCAAGCA GCGCTGGAG ACGGTGCAGC GGCTGTTGCC GGTGCTGTGC  
 ap13 CCA

ap11 CAGGCCCATG GGCTGACCC GGAGCAGGTG GTGGCCATCG CCAGCAATAT TGGTGGCAAG CAGGCGCTGG AGACGGTGA GCGGTGTTG CCGGTGCTGT

ap11 GCCAGGCCCA TGGCTGACC CCGGAGCAGG TGGTGGCAT CGCCAGCAAT ATTGGTGGCA AGCAGGCGCT GGAGACGGTG CAGCGGCTGT TGCCGGTGTCT  
 ap12 C C GA C  
 ap13 C C GA C

ap11 GTGCCAGGCC CATGGCCTGA CCCCCGACA GGTGGTGGEC ATCGCCAGCA ATATTGGTGG CAAGCAGGCG CTGGAGACGG TGCAGCGGCT GTTCCCGGTG

ap12 AG  
 ap13 AG

pthA A T G C T

ap11 CTGTGCCAGG CCGATGGCTT GACCCCGGAG CAGGTGGTGG CCATCGCCAG CCACGATGGC GGCAAGCAGG CGCTGGAGAC GGTGCAGCGG CTGTTGCCCG

pthA C

ap11 TGCTGTGCCA GGCCATGCC CTGACCCCGG AGCAGGTGGT GGCCATCGCC AGCCACGATG GCGGCAAGCA GCGCTGGAG ACGGTGCAGC GGCTGTTGCC  
 ap12 C  
 ap13 C

pthA C

pthA C



ap11 GGTGCTGTGC CAGGCCCATG GCCTGACCCC GGAGCAGGTG GTGGCCATCG CCAGCAATGG CGGTGGCAAG CAGGCGCTGG AGACGGTGCA GCGGCTGTG  
ap12 C  
ap13 C

ap11 CCGGTGCTGT GCCAGGCCCA TGGCTGACC CCGGAGCAGG TGGTGGCCAT CGCCAGCCAC GATGGCGGCA AGCAGGCGCT GGAGACGGTG CAGCGGCTGT

ap11 TGCCGGTGTCT GTGCCAGGCC CATGGCTGA CCCCAGGACA GGTGGTGGCC ATGCCAGCA ATGGCGGTGG CAAGCAGGCG CTGGAGACGG TGCAGCGGCT  
ap13 C C AT C

ap11 GTTCCCGTG CTGTGCCAGG CCCATGGCCT GACCCCGAG CAGGTGGTGG CCATCGCCAG CAATGGCGGT GGCAGCAGG CGCTGGAGAC GGTGCAGCGG  
ap13

ap11 CTGTTGCCGG TGCTGTGCEA GGCCATGGC CTGACCCCGG AGCAGTGGT GGCCATCGCC AGCAATGGCG GTGGCAAGCA GCGGCTGGAG ACGGTGCAGC  
ap13 ATT

ap11 GGCTGTTGCC GGTGCTGTGC CAGGCCCATG GCCTGACCCCT GGACCAGGTC GTGGCCATCG CCAGCAATGG CGGTGGCAAG CAGGCGCTGG AGACGGTGCA  
ap13 C G G C C A T C

ap11 GCGGCTGTTG CCGGTGCTGT GCCAGGCCCA TGGCTGACC CCGGAGCAGG TGGTGGCCAT CGCCAGCAAT AGCGGTGGCA AGCAGGCGCT GGAGACGGTG  
ap12 TT  
ap13 C C AT C

ap11 CAGCGGCTGT TGCCGGTGTCT GTGCCAGGCC CATGGCTGA CCCCAGGACA GGTGGTGGCC ATGCCAGCC ACCATGGTGG CAAGCAGGCG CTGGAGACGG  
pthA T C A T GC  
ap12 C G G TATT

ap11 TGCAGCGGCT GTTCCCGTG CTGTGCCAGG CCCATGGCCT GACCCCGAG CAGGTGGTGG CCATCGCCAG CCACGATGGC GGCAGCAGG CGCTGGAGAC  
ap12

ap11 GGTGCAGCGG CTGTTGCCGG TGCTGTGCEA GGCCATGGC CTGACCCCGG ACCAGTGGT GGCCATCGCC TGCAGTGGCG GCGCAAGCA GCGGCTGGAG  
ap12 -----  
ap13 G AGCCACGATG GCGGC

ap11 ACGGTGCAGG GGCTGTTGCC GGTGCTGTGC CAGGCCCATG GCCTGACCCC GGAGCAGGTG GTGGCCATCG CCAGCAATGG CCGGCGCAGG CCGGCGCTGG  
ap12 -----  
ap13 {★612bp(6 units)}

ap11 AGAGCATTGT TGCCAGTTA TCTCGCCCTG ATCCGGCGTT GCGCGCGTTG ACCAACGACC ACCTGTCGC CTTGGCCTGC CTCGGCGGAC GTCCTGCGCT  
the end of repeating region

ap11 GGATGCAGTG AAAAAGGGAT TGCCGCAGCG GCCGGCCTTG ATCAAAGAA CCAATCGCCG TATTCGGAA CGCACATCCC ATCGCGTTCG CGACCACGGG  
leucine zipper

ap11 CAAGTGGTTC GCGTGTGGG TTTTTCAG TGCCACTCCC ACCCAGCGCA AGCATTGAT GACGCCATGA CGCAGTTCGG GATGAGCAGG CACGGTGTGT

ap11 TACAGCTCTT TCGCAGATG GGCGTCACCG AACTCGAAGC CCGCAGTGGG ACCTCCCCC CAGCCTCGCA GCGTTGGGAC CGTATCCTCC AGGCATCAGG

ap11 GATGAAAAGG GCCAAACCGT CCCCTACTTC AACTCAAACG CCGGACCAGG CGTCTTTGCA TGCATTGCCC GATTCGCTGG AGCGTGACCT TGATGCGCCC  
NLS

ap11 AGCCCAACGC ACGAGGGAGA TCAGAGCGG GCAAGCAGCC GTAACCGTC CCGATCGGAT CGTGTGTCA CCGTCCCTC CGCACAGCAA TCGTTCGAGG  
NLS

ap11 TGCCGGCTCC CGAACAGCGG GATGCGCTGC ATTTGCCCT CAGTTGGAGG GTAACCGCC CGCGTACCAG TATCGGGGGC GGCCTCCCGG ATCCTGGTAC  
NLS

ap11 GCCCACGGCT GCCGACTGG CAGCGTCCAG CACCGTATG CGGGAACAAG ATGAGGACCC CTTCGCAGGG GCAGCGGATG ATTTCCCGGC ATTCACGAA



ap1 GAGGAGCTCG CATGGTTGAT GGAGCTATTG CCTCAGTGAG GCTCAGTCGG TGACTACCTG AGCGTCGGCA GGGATTGGTG TAAGTAACCT TTA CTGACAG  
Terminal codon

ap1 CGAGTTAGCC CACTTTTGGC TGTTTTTAC ACAATCCCT GCCTCCCTC ACCTGGGCAC GCAGTCCCTC GGTGGGCATC AATCGATGCA CCGATGGCGA  
LTR(15)

ap12 GGGG TTCGGGGAGC AATGGAACAG GGAAGTCAGT TAAGCCTCA CCAGTGCCGG TCTGTACCTT CCATGCGGGC GTGGCTCTCT  
ap13 TCTCGTCTCT GCGGGCTACG AGTAGCAATG GAACAGGGAA GTCAGTAGGC

ap1 CTGCAACGTC ACCAGATCGG TAGATCC

ap2 GAGAAACAGT GCGGTCATC CGCACCG

ap3 ATAAAACCTT TCATTGCCAT AATGAGC

★612bp(6 units)

CTGACCCCGG AGCAGGTGGT GGCCATCGCC AGCAATGGCG GTGGCAAGCA GCGCTGGAG ACGGTGCAGC GGCTGTTGCC GGTGCTGTGC CAGGCCCATG  
GCCTGACCCC GGAGCAGGTG GTGGCCATCG CCAGCCACGA TGGCGGCAAG CAGGCCTGG AGACGGTGCA GCGGCTGTTG CCGGTGCTGT GCCAGGCCCA  
TGGCCTGACC CCGGAGCAGG TGGTGGCCAT CGCCAGCAAT GCGGTGGCA AGCAGGCGCT GGAGACGGTG CAGCGGCTGT TGCCGGTGTG GTGCCAGGCC  
CATGGCCTGA CCCCAGGAGCA GGTGGTGGCC ATCGCCAGCA ATATTGGTGG CAAGCAGGCG CTGGAGACGG TGCAGCGGCT GTTCCCGGTG CTGTGCCAGG  
CCCATGGCCT GACCCCGGAG CAGGTGGTGG CCATCGCCAG CCACGATGGC GGCAAGCAGG CGCTGGAGAC GGTGCAGCGG CTGTGCCCCG TGCTGTGCCA  
GGCCCATGGC CTGACCCCGG AGCAGGTGGT GGCCATCGCC TGCAATGGCG GTGGCAAGCA GCGCTGGAG ACGGTGCAGC GGCTGTTGCC GGTGCTGTGC  
CAGGCCCATG GC

Fig. 14. ap1, ap2, ap3の塩基配列の比較



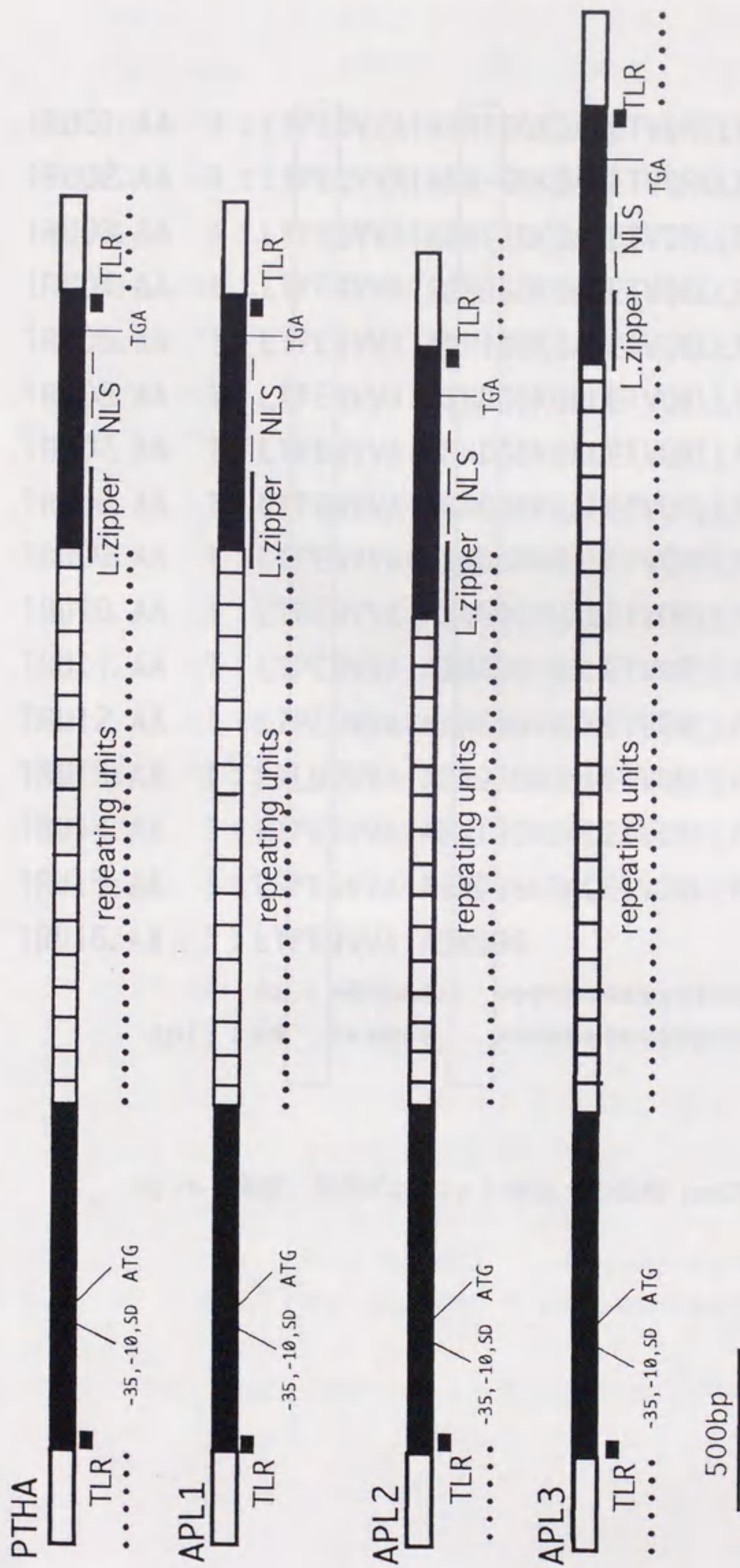


Fig. 15 APL1、APL2、APL3の模式図



1RU01. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU02. AA	1	: LTPEQVVAIASN-GGKQALETVQRLLPVLCQAHG	33
1RU03. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU04. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU05. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU06. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU07. AA	1	: LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU08. AA	1	: LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU09. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU10. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU11. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU12. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU13. AA	1	: LTLDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU14. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU15. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
1RU16. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGG	15

```

** ***** *****
apl1 : ** ***** *****

```

Fig.16-1 繰返し配列のユニット単位での比較 (apl2)



RU01. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU02. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU03. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU04. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU05. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU06. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU07. AA	1	: LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU08. AA	1	: LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU09. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU10. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU11. AA	1	: LTPEQVVAIASN-GGKQALETVQRLLPVLCQAHG	33
RU12. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU13. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU14. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU15. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU16. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU17. AA	1	: LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU18. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU19. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU20. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU21. AA	1	: LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU22. AA	1	: LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU23. AA	1	: LTPEQVVAIACNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG	34
RU24. AA	1	: LTPEQVVAIASNGGG	15

\*\*\* \*\*\*\*\*  
*apl1* : \*\* \*\*\*\*\*

Fig.16 繰返し配列のユニット単位での比較 (*apl3*)



<i>pthA</i>	249	TCTGTTCCGGCCAAGCGCCGCCGGTACACAGTCTCAACCTTGTAGAGCTTC
<i>apl1</i>	1	TCTGTTCCGGCCAAGCGCCGCCGGTACACAGTCTCAACCTTGTAGAGCTTC
<i>apl2</i>	1	GACAACCAGCTCAACCTTGAACCAAGCGTCTTCAGACATGGCAACGTACT
<i>apl3</i>	1	CGGCCAATCCAGATCCACGCTGGCCGGGCGCAAGAAGGTGATCGACCC
<i>pthA</i>	298	CCGCGCGGGAGTTTATGGATGGTTGTCCCGTCGACGGGGTAGCAGGAGAT
<i>apl1</i>	51	CCGCGCGGGAGTTTATGGATGGTTGTCCCGTCGACGGGGTAGCAGGAGAT
<i>apl2</i>	51	CGCCGATCATAGGAATGCKGCCGAACCTCACGCTCTTCGTTAAGCCAATCT
<i>apl3</i>	51	GGAAACGGGGGAACCCGTGTCAAAGCCGCGCTGGCCAAGCGCAAGAAAA
<i>pthA</i>	349	GAGGGTCGGCAGGGATTGGTGTAAAAAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCG
<i>apl1</i>	101	GAGGGTCGGCAGGGATTGGTGTAAAAAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCG
<i>apl2</i>	101	GAGGGTCGGCAGGGATTGGTGTAAAAAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCG
<i>apl3</i>	101	GAGGGTCGGCAGGGATTGGTGTAAAAAACAGCCAAAAGTGAGCTAACTCG
<i>pthA</i>	399	CTGTCAGCACAGAAATTTTTCACAACCTTCTGCCGATCCTCCATGCGGGT
<i>apl1</i>	151	CTGTCAGCACAGAAATTTTTCACAACCTTCTGCCGATCCTCCATGCGGGT
<i>apl2</i>	151	CTGTCAGCACAGAAATTTTTCACAACCTTCTGCCGATCCTCCATGCGGGT
<i>apl3</i>	151	CTGTCAGCACAGAAATTTTTCACAACCTTCTGCCGATCCTCCATGCGGGT
<i>pthA</i>	4076	TTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTGACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG
<i>apl1</i>	3828	TTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTGACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG
<i>apl2</i>	3624	TTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTGACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG
<i>apl3</i>	4440	TTGCCTCAGTGAGGCTCAGTCGGTGACTACCTGAGCGTCGGCAGGGATTG
<i>pthA</i>	4126	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCACTTTTGGCTGTTTTT
<i>apl1</i>	3878	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCACTTTTGGCTGTTTTT
<i>apl2</i>	3674	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCACTTTGGGGTTCGGGG
<i>apl3</i>	4490	GTGTAAGTAACCTTTACTGACAGCGAGTTAGCCCACTTTTGGCTGTTTTT
<i>pthA</i>	4176	TACACAAATCCCTGCCTCCCCTCACCTGGGCACGCAGTCCCTCGGTGCGC
<i>apl1</i>	3928	TACACAAATCCCTGCCTCCCCTCACCTGGGCACGCAGTCCCTCGGTGCGC
<i>apl2</i>	3724	AGCAATGGAACAGGGAAGTCAGTTAAGCCTTCACCAGTGCCGGTCTGTAC
<i>apl3</i>	4540	TACACAAATCCCTGCCTCCCCTCTCTCGTCTCTGCGGGCTACGAGTAGCA
<i>pthA</i>	4226	ATCAATCGATGCACCGATGGCGACTGCAACGTCACCAGATCGGTAGATCC
<i>apl1</i>	3978	ATCAATCGATGCACCGATGGCGACTGCAACGTCACCAGATCGGTAGATCC
<i>apl2</i>	3774	CTTCCATGCGGGCGTGGCTCTCTGAGAAACAGTGGCGGTATCCGCACCG
<i>apl3</i>	4590	ATGGAACAGGGAAGTCAGTAGGCATAAAACCTTTCATTGCCATAATGAGC

Fig. 17 *apl1*, *apl2*, *apl3*各領域における境界領域の比較  
 点線は境界領域、下2重線はLTR、下線はISXc5を示す。



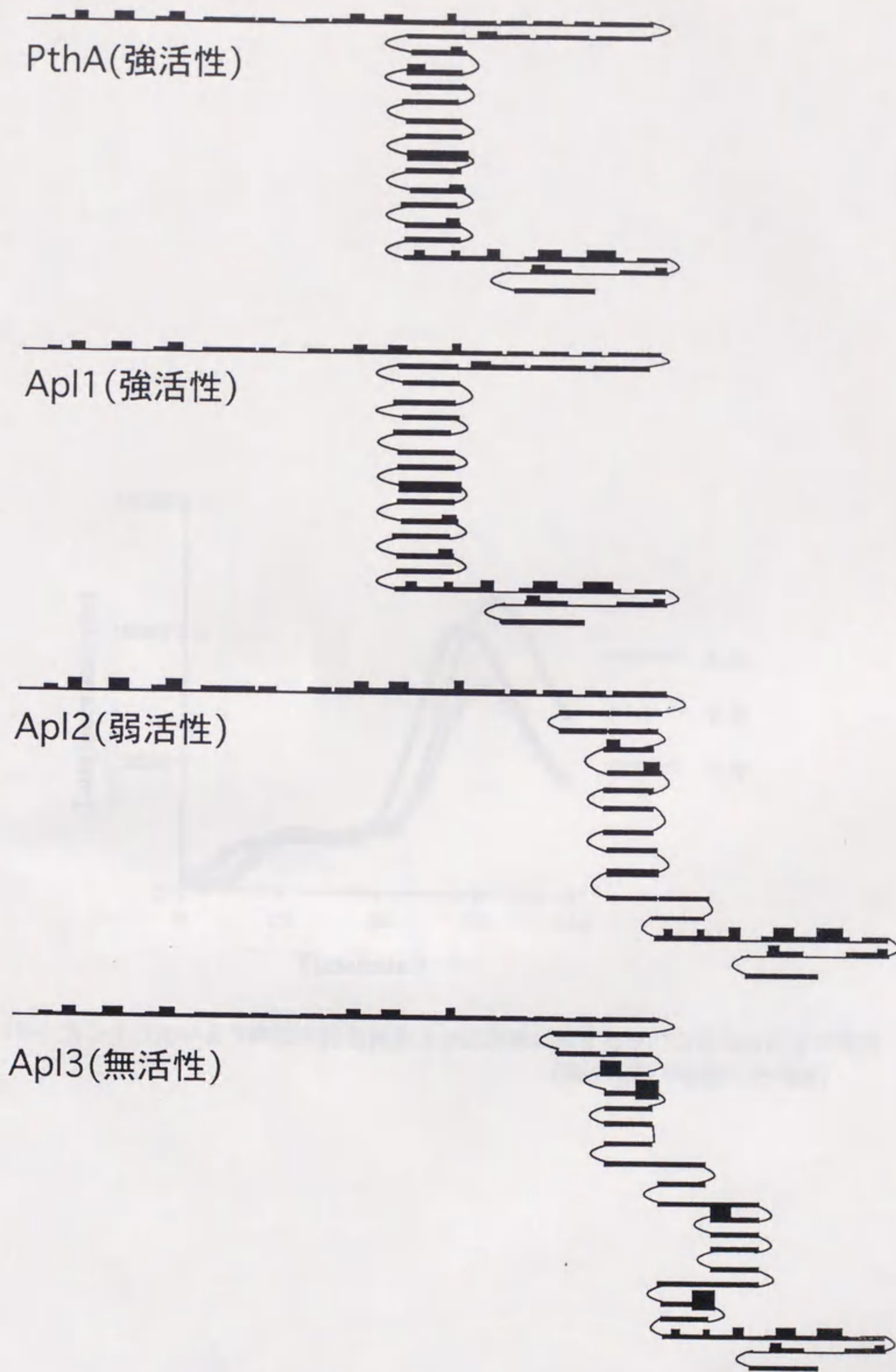


Fig. 18 CHOU-FASMAN法に基づいたAplタンパクの二次構造予測  
太さ順で $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, coilとなっている。



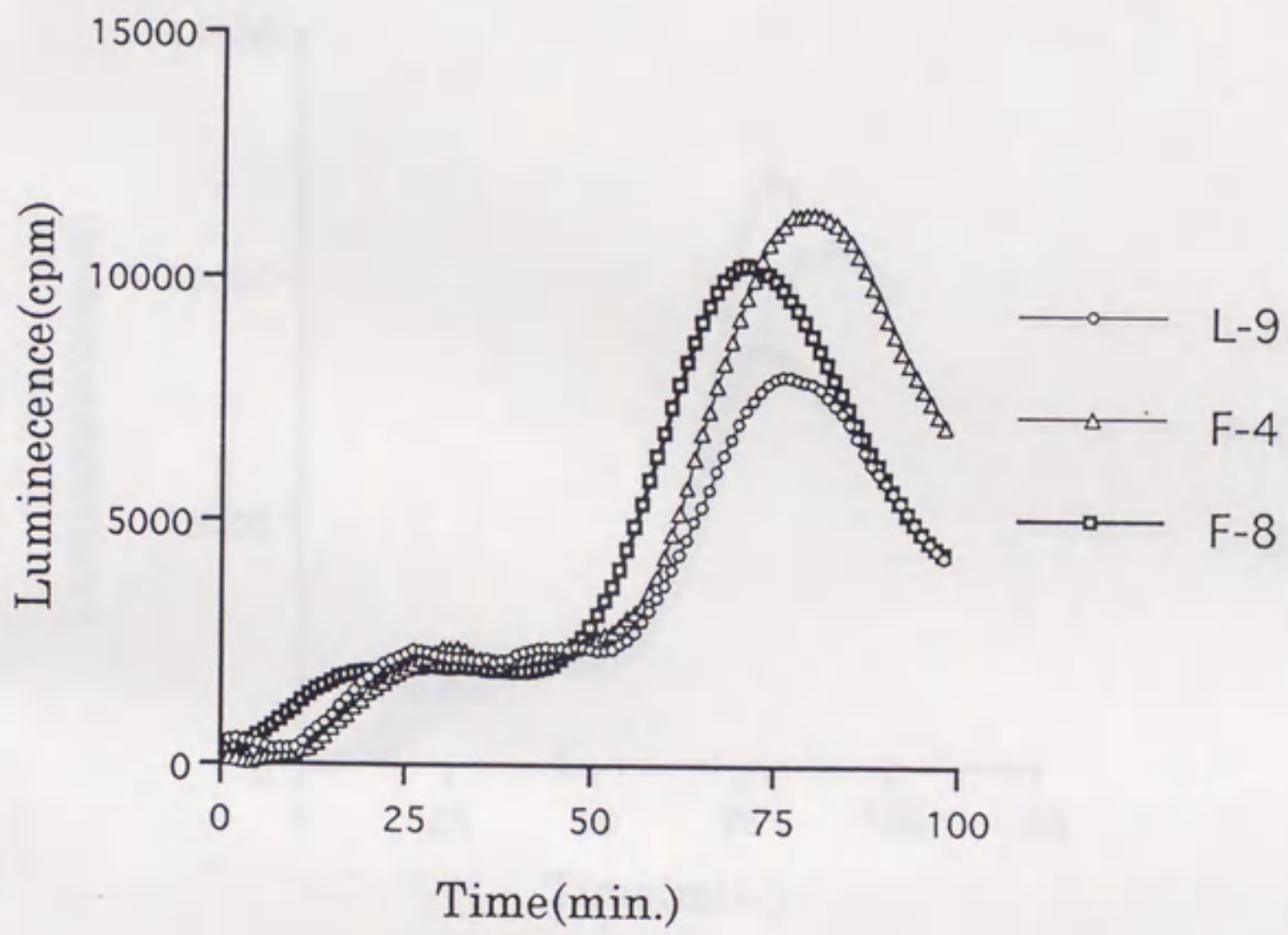


fig. 19-1 カンキツかいよう病菌の野性株および変異株に対するタバコカルスの化学発光  
(最小培地で培養した場合)



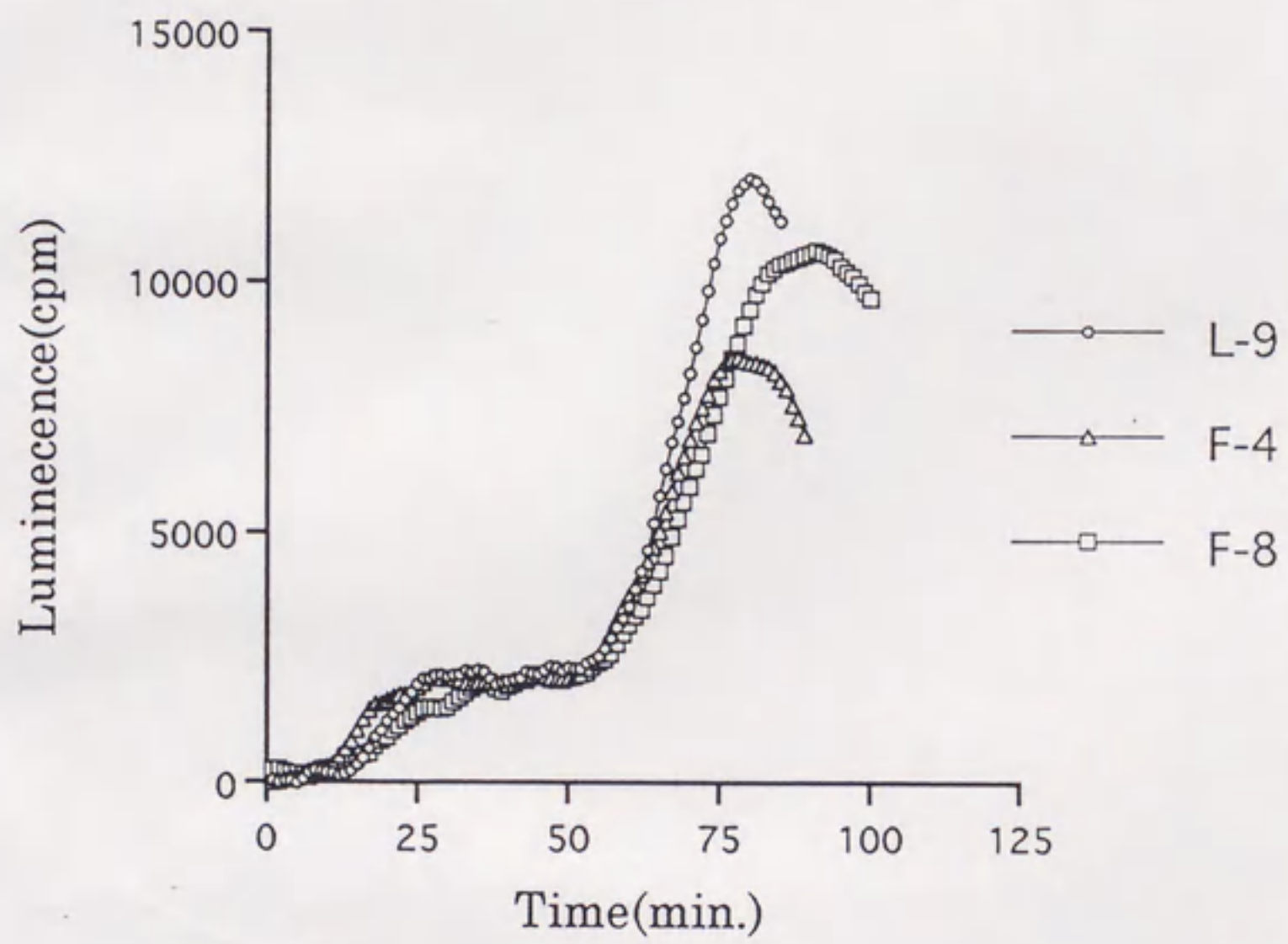


fig. 19-2 カンキツかいよう病菌の野性株および変異株に対するタバコカルスの化学発光  
(誘導培地で培養した場合)







