

イネもみ枯細菌病菌の病原性遺伝子の解析に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2011-04-15 キーワード (Ja): イネもみ枯細菌病, イネもみ枯細菌病菌, Burkho Ideria Glumae, 病原性遺伝子 キーワード (En): 作成者: 新宮, 良宣 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/11042

生090.1-127

正



イネもみ枯細菌病菌の病原性遺伝子の

解析に関する研究

新宮良宣

目次

緒言	1
第 I 章 イネもみ枯細菌病菌の病原性欠損変異株の作出と解析	8
実験材料及び方法	11
1. 供試菌株およびプラスミド	11
2. 培地と培養条件	11
3. 大腸菌プラスミド DNA の調製法	14
4. イネもみ枯細菌病菌からのゲノム DNA の調製法	14
5. 制限酵素処理	15
6. ライゲーション	16
7. 大腸菌への形質転換	16
8. サザンハイブリダイゼーション	17
9. PCR 法	18
10. 塩基配列の決定と解析	20
11. 遺伝子破壊用ベクターの構築	20
12. イネもみ枯細菌病菌の形質転換	21
13. イネもみ枯細菌病菌からの RNA 抽出法	21
14. Reverse Transcriptase (RT) -PCR 法	22
15. 毒素の抽出と精製	23
16. 毒素産生能と毒素耐性試験	23
17. 発病試験	24

結果	25
1. 病原性欠損変異株 No. 19 に対する相補ゲノム DNA 断片の解析	25
2. ゲノム上における Tn4431 挿入箇所と IS との関係	39
3. IS1417 による遺伝子発現制御	47
4. IS 転移による毒素産生能の復帰	50
5. <i>bgp1</i> 遺伝子および IS1417 の遺伝子破壊株と毒素産生能との関係	52
6. 変異株 No. 19 および <i>bgp1</i> 遺伝子破壊株 MY403 のトキシフラビン感受性	57
考察	63
第 II 章 トキシフラビン生合成遺伝子系の解析	69
実験材料及び方法	71
1. 供試プラスミドおよびプライマー	71
2. 遺伝子クローニング法	71
3. 遺伝子破壊用ベクターの構築	74
4. 大腸菌におけるタンパク質生産	74
5. ゲルシフト法	75
結果	77
1. トキシフラビン生合成遺伝子の単離・同定	77
2. トキシフラビン生合成遺伝子の転写と温度制御	91
3. トキシフラビン生合成とリボフラビン生合成との関係	95

4. <i>toxR</i> 遺伝子破壊株の解析	96
5. <i>toxR</i> 遺伝子の転写活性因子としての役割	103
考察	107
総合考察	113
要旨	117
参考文献	125

緒言

イネもみ枯細菌病はわが国において 1955 年福岡県の水田で初めて発生が確認された（後藤・大畑, 1956）。本病の病原菌はイネもみ枯細菌病菌 *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei と命名された（後藤・大畑, 1958）。1971 年に、本病原菌の病原性、細菌学的性質、血清学的性質等について類縁細菌と比較検討され、新種の細菌であることが確認された（富永, 1971）。1992 年に 16S rRNA 配列、DNA-DNA ホモロジー、細胞脂質、脂肪酸構成を基本とした分類により *Pseudomonas* 属の RNA ホモロジーグループ II に属することから *Burkholderia glumae* と改名された（Yabuuchi et al., 1992）。

近年、日本におけるイネもみ枯細菌病の発生は全国的に発生しており、主に西南暖地に多く発生している（茂木, 1984; 茂木, 1985; 植松, 1985; 十河, 1985）。そして、海外では 1972 年にタイで、1975 年にマレーシアなどで発生が確認された（田部井, 1976）。1976 年に本病が箱育苗において幼苗の腐敗症を引き起こすことが報告された（植松ら, 1976a; 植松ら, 1976b）。また、農業の機械化にともない、イネの箱育苗の普及とともに苗腐敗症が多発している（藤井・植松, 1976; 松田・佐藤, 1981; 畔上, 1985）。本病は発生変動が大きく、伝染環など不明な点も多く、本病の発生予測及び防除法の確立が困難である（吉田・吉村, 1965）。この様な点からイネの重要病害として問題になっている。

イネもみ枯細菌病による病徴の特徴は、本田におけるもみ枯症では一般に

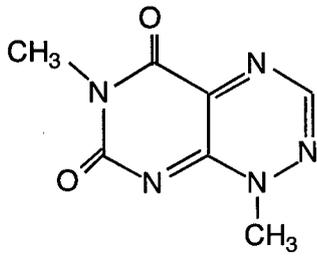
出穂後の開花期以降の穂に生じ、発病の激しい場合は傾穂期になっても傾穂せずに直立したままになる。これらの穂は着生もみが不稔であったり、稔実が不十分となり、穂が淡紅色を呈した黄褐変穂となるという特徴をもっている(関, 1959; 久原ら, 1967; 茂木, 1984; 茂木・対馬, 1984; 茂木, 1985)。また、苗腐敗症は、催芽、出芽、緑化期において高温多湿となる箱育苗で主に発生する。催芽時の幼芽苗は白色であるが、罹病した幼芽は褐色からあめ色に変色し次第に腐敗、枯死する。腐敗せずに残った幼苗は緑化時にその葉鞘に淡褐色の病斑が現れ、葉鞘内から伸長してくる新葉は彎曲して出葉する。箱育苗では激しく腐敗した稚苗を中心に坪枯症状を呈してくる。(畔上, 1985; 藤井・植松, 1976) しかし、軽い症状の幼苗は葉鞘腐敗及び褐変を起こしても異常生育を示すだけで次第に回復する(植松ら, 1976a; 植松ら, 1976b)。

本菌がイネの重要病原菌であるにも関わらず病原性に関しては不明な点が多い。病原性とプラスミドの関連性については、病原性の発現に対しプラスミドは関与していないことが報告されている(Kamiunten et al., 1985)。また、病原性菌株においては細胞壁分解酵素であるポリガラクトツロナーゼ(PG)の高い生産性を示すことから、本病の腐敗症発現に PG が密接に関与している可能性が示唆されている(飯山ら, 1994)。

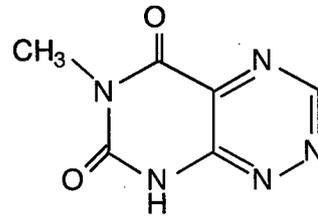
しかし、最近イネもみ枯細菌病菌の病原性因子の一つとして毒素が重要であることが明らかとなった。多くの植物病原細菌、特に *Pseudomonas* 属の場合には多くの種が非特異的毒素を産生し、その非特異的毒素が病徴の発現と深く関わっていることが知られてる(Taylor et al., 1972)。例えば、それらの

中で病原性に関連している毒素として、タバコ野火病菌 (*P. syringae* pv. *tabaci*) のタブトキシシン (Taylor et al., 1972)、インゲンかさ枯病菌 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*) のファゼオロトキシシン (Mitchell et al., 1977)、ライグラス類かさ枯病菌 (*P. syringae* pv. *atropurpurea*) のコロナチン (Bender et al., 1989)、イネ苗立枯細菌病菌 (*Burkholderia plantarii*) のトロポロン (Azegami et al., 1988)、核果類に病気を引き起こす *P. syringae* pv. *syringae* の系統のシリngoマイシン (Zhang et al., 1986; Bender et al., 1999a) などが挙げられる。これらの毒素は病原菌の感染、病徴の発現など病原菌の病原力として重要な役割を果たしている。また、それらの毒素生合成遺伝子に変異を与えることにより毒素産生能を欠失すると同様に病原性も失活することが知られている (Gross, 1991)。植物病原菌の毒素生合成経路や生合成遺伝子について明らかにすることは、病害防除法を開発する上で重要であり、数多くの研究が行われている (Bender et al., 1999b)。

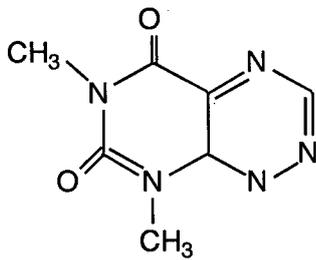
イネもみ枯細菌病菌では、イネ葉に白色壊死斑を形成する毒素物質を産生することが示唆され (白田ら, 1986)、本菌の産生する毒素がイネの生育阻害を引き起こすことや、毒素を処理したイネ穂が本病特有の病徴である褐色帯条斑を形成することから、毒素が病原性の発現と深く関与していることが示唆された (飯山ら, 1994; Iiyama et al., 1995)。さらに、培養液中に存在する毒素として、図1に示すようなトキシフラビン、ファーベヌリン、リュウマイシンの3種の毒素が同定された (佐藤ら, 1989)。これらの中で、最も毒性が



トキシフラビン



リュウマイシン



ファーベヌリン

図1. イネもみ枯細菌病菌の産出する毒素の構造式

高く、培養液中に多く産生される毒素はトキシフラビンであり、リュウマイシンはトキシフラビン分解物であることが示唆された。トキシフラビンは極めて強い電子伝達物質であり酸素存在下で過酸化水素を発生し、酵母以外の生物に対して強い毒性を示すことが知られている (Latuasan, 1966)。Yoneyama ら (1998) は、イネもみ枯細菌病菌をトランスポゾンにより変異を起こし、毒素生合成能と病原性を欠損させたイネもみ枯細菌病菌変異株 No. 19 を作出した。この変異株に対し、野性株ゲノミックライブラリー由来のコスミドを導入した毒素生合成回復株 No. 19-61 では病原性が野生株と同程度に回復されることから、本菌の産出する毒素と病徴の発現とが密接に関係していることを明らかにした。最近、イネもみ枯細菌病菌が多くの穀物類の萎凋病斑から単離され、その萎凋病徴の形成にトキシフラビンが関与していることが示唆されている (Jeong et al., 2003)。

トキシフラビン生合成遺伝子に関する研究では、Suzuki ら (1988a) がイネもみ枯細菌病菌の毒素産出株と非産出株において、二次元電気泳動法による産出タンパク質の比較を行い、毒素生合成に関わる TRP-1 および TRP-2 タンパク質を単離することに成功した。さらに、その TRP-1 タンパク質をコードする *toxA* 遺伝子を単離し、そのアミノ酸配列の相同性から、TRP-1 はメチルトランスフェラーゼであることを明らかにした (Suzuki et al., 1988b)。また、この *toxA* 遺伝子を破壊した変異株では病原性の欠失とともに、トキシフラビンの生産能が消失することから、*toxA* 遺伝子はトキシフラビンのメチル基付加に深く関与することを示唆した。さらに、鈴木らは、*toxA* 遺伝子下流から

4つの *tox*B, C, D, E 遺伝子を単離し、これらがトキシフラビン生合成クラスターを形成していることを示唆した（鈴木ら, 1999）。しかしながら、現在までにトキシフラビン生合成の制御遺伝子およびその詳細な経路については明らかにされていない。

以上の点から、本研究ではイネもみ枯細菌病菌の病原毒素トキシフラビンの産出に関与する遺伝子の解析、およびその生合成遺伝子の発現制御について明らかにすることを目的とした。

第1章では毒素産生欠損変異株 No. 19 を用いて、本菌の病原性および毒素産生に関与する遺伝子について解明し、本菌のトキシフラビン耐性に関与する遺伝子の同定、およびその遺伝子が IS 因子によって制御されていることを明らかにした。また、第2章ではトキシフラビン生合成遺伝子の単離および制御遺伝子の探索、解析を行い、トキシフラビン生合成に関わる制御遺伝子の同定およびその制御機構について明らかにした。本論文はこれらの結果をまとめたものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始親切なる御指導・御助言を頂きました明治大学農学部米山勝美教授に深く感謝の意を表します。

貴重な菌株を快く分譲して頂いた日本農薬株式会社の堀越守氏、廣岡卓氏に厚く感謝の意を表します。

実験、分析機器等に関して、御助言頂きました明治大学農学部前田理久助教授、理化学研究所の木村真博士、株式会社ジーンケア研究所の高木基樹博士に厚く感謝の意を表します。

また研究室での生活にあたり、様々な形でお世話になりました明治大学農学部植物病理学研究室の皆様へ深く感謝致します。

第 I 章 イネもみ枯細菌病菌の病原性欠損変異株の作出と解析

これまで、多くの植物病原細菌の研究において、変異株作出は最も有効な手段として、様々な作出法が用いられてきた。インゲンかさ枯病菌においては、UV 変異法、エチルメタンスルホン酸による変異法、トランスポゾンタギング法が用いられ、ファゼオロトキシン生合成遺伝子がクローニングされた (Zhang et al., 1993)。またタバコ野火病菌のタブトキシンおよびダイズ斑点細菌病菌 (*P. syringae* pv. *glycinea*) のコロナチンの研究においても、トランスポゾン変異株を用いた生合成遺伝子の単離に成功している (Kinscherf et al., 1991; Ullrich et al., 1995)。トランスポゾンタギング法は、ゲノム中に何方所の変異が起きたかが明確である上に、変異部位をマーカー化できることから、未知遺伝子の解析には最も有効な研究手段であると考えられる。

そのため、イネもみ枯細菌病菌においてもトランスポゾンタギング法を用いた変異株の作出が行われた。図 2 に示すように、イネもみ枯細菌病菌とスーパーサイドベクター pUCD623 を持つ大腸菌を接合伝達させ、トランスポゾン Tn4431 が導入された毒素産生および病原性欠損変異株 No. 19 が選抜された。さらにそのゲノムライブラリーより Tn4431 を含むコスミド pNP19-1 が得られ、その Tn4431 を含むゲノム DNA 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い、野生株のゲノムライブラリーよりコスミド pNP147 が選抜された。この pNP147 を変異株 No. 19 に導入した形質転換株 No. 19-61

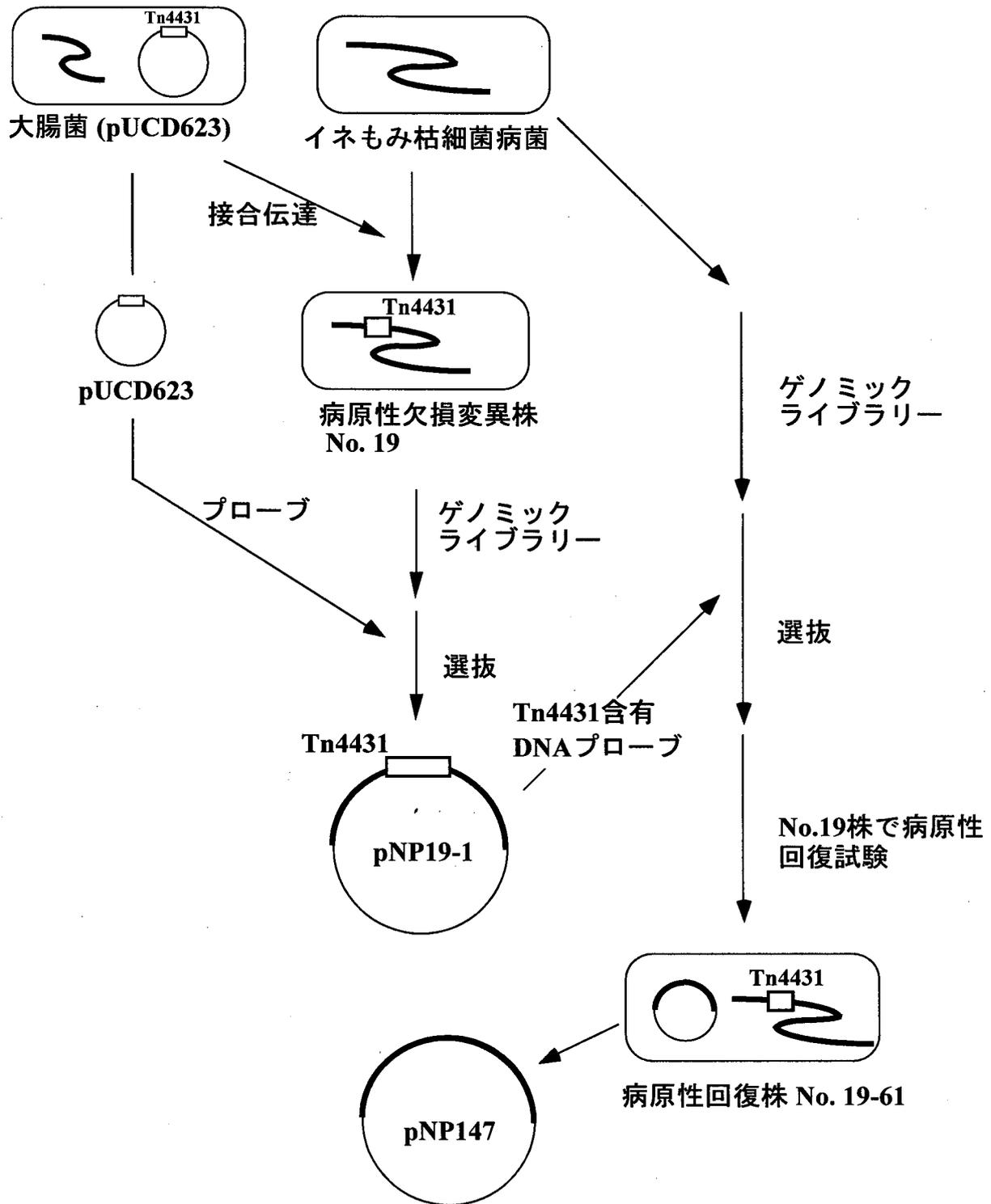


図2. 毒素産生欠損変異株No. 19の作出と回復プラスミドpNP147の単離

においては、毒素産生能と病原性を回復したことから、コスミド pNP147 には毒素産生および病原性関連遺伝子がクローニングされているものと考えられた。そこで、本章では pNP147 に挿入されたゲノム DNA および変異株 No.19 について解析を行い、病原性関連遺伝子について明らかにすることを目的とした。

実験材料及び方法

1. 供試菌株およびプラスミド

本研究に使われた菌株およびプラスミドは、それぞれ表 1 および表 2 に示した。イネもみ枯細菌病菌 Kyu 82-34-2 は九州農業試験場より分譲を受けた。

菌株の保存は、スキンミルク分散媒（10 % スキムミルク、80 mM グルタミン酸ナトリウム）の中で-20 °C、あるいは-80 °C で凍結保存した（茂木, 1985）。また、液体培養の場合は、最終濃度 7 % になるようにジメチルスルホキシドを加えるか、最終濃度 25 % なるようにグリセロールを加え、-20 °C あるいは-80 °C で凍結保存した（西山, 1977）。

2. 培地と培養条件

大腸菌の培養 (Sambrook et al., 1989) には LB 培地 (Bacto tryptone 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10 g/l)、SOC 培地 (Bacto tryptone 20 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10.5 g, グルコース 3.6 g, KCl 0.17 g, MgCl₂·6H₂O 2.03 g, 10 mM MgSO₄·7H₂O 2.46 g/l)、SOB 培地 (Bacto tryptone 20 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10.5 g, KCl 0.17 g, MgCl₂·6H₂O 2.03 g, MgSO₄·7H₂O 2.46 g/l) を使用し、37 °C にて振盪培養を行った。LB 固形培地は最終濃度 1.5 % になるように寒天を加えた。抗生物質は最終濃度がアンピシリン (Ap) 100 μg/ml、クロラムフェニコール (Cm) 25 μg/ml、カナマイシン (Km) 25 μg/ml、ストレプトマイシン (Sm) 100 μg/ml、テトラサイクリン (Tc) 10 μg/ml になるように

表 1. 供試菌株

菌株	性質
大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	
DH5 α	<i>deoR, endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, \Delta(lacZYA-argF)u169, \phi 80Z\Delta M15, F^-, \lambda^-</i>
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, \Delta(lac-proAB), [F^+ traD36, proAB^+, lacI^q, lacZ \Delta M15]</i>
HB101	<i>supE, hsdS20(rB- mB-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1</i>
イネもみ枯細菌病菌 <i>Burkholderia glumae</i>	
Kyu82-34-2	野生株
No. 19	Tn4431 挿入による毒素産生欠損変異株、Tc 耐性
No. 19-61	No. 19 変異株に pNP147 を導入した菌株、Tc および Km 耐性
MY402	相同組換えにより IS1417 トランスポザージ遺伝子を破壊した菌株、Km 耐性
MY403	相同組換えにより <i>bgp1</i> 遺伝子を破壊した菌株、Km 耐性

表 2. 供試プラスミド

プラスミド	毒素耐性	特性	参考文献
pUC18	Ap	クローニングベクター	
pUCD615	Km, Ap	コスミドベクター	Rogowsky et al., 1987
pUCD623	Km, Tc, Ap	Tn4431 を含むスーサイドベクター	Shaw et al., 1988
pNP147	Km	イネもみ枯細菌病菌野生株のゲノム DNA30 kb 断片を挿入したコスミド	Yoneyama et al., 1998
pNP19-1	Tc, Km	イネもみ枯細菌病菌 No. 19 株の Tn4431 を含む領域を挿入したコスミド	Yoneyama et al., 1998
pJB4JI	Km	Km 耐性の Tn5 を含むスーサードベクター	Srivastava et al., 1982
pR2YE	Ap, Km	pUC18 の <i>Hind</i> III サイトに pJB4JI の Km 耐性遺伝子 1.3 kb 断片を挿入したプラスミド	本研究
pUC401	Ap	pUC18 の <i>Eco</i> R I サイトに pNP147 由来の 2.6 kb 断片を挿入したプラスミド	
pMY402	Ap, Km	pUC401 の <i>Hind</i> III サイトに pR2YE の Km 耐性遺伝子 1.3 kb 断片を挿入したプラスミド	本研究
pMY403	Ap, Km	pUC18 の <i>Eco</i> RI- <i>Pst</i> I サイトに <i>bgl</i> 1 遺伝子断片 0.8 Kb および pR2YE の Km 耐性遺伝子 1.3 kb 断片が挿入したプラスミド	本研究

培地に添加した。

イネもみ枯細菌病菌の培養には King's B (Bacto pepton 20 g, K_2HPO_4 1.5 g, glycerin 10 ml, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.6 g/l) 培地 (King, 1954) と毒素産出用培地 (松田・佐藤, 1988) として CaPG 培地 (potato 200 g, Bacto peptone 5 g, glucose 15 g, $CaCl_2$ 1 g/l) を用い、28 °C もしくは 37 °C にて振盪培養を行った。固形培地は King's B 培地では最終濃度 1.5 % になるように、CaPG 培地では 2 % になるように寒天を加えた。抗生物質は最終濃度が Cm 25 μ g/ml、Km 50 μ g/ml、Sm 200 μ g/ml、Tc 10 μ g/ml になるように培地に添加した。

3. 大腸菌プラスミド DNA の調製法

プラスミドを保有する大腸菌を所定の抗生物質を含む LB 培地 1.5 ml に植菌し、37 °C、120 rpm で一晩振盪培養後、菌体を 1.5 ml のマイクロチューブを用いて集菌し、アルカリ-SDS 法によりプラスミドを抽出した (Sambrook et al., 1989)。得られたプラスミドを TE 溶液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム: EDTA) 50 μ l に溶解し、RNaseA 1 mg/ml を 1 μ l 加え、37 °C 30 分間の RNase 処理を行った。その後等量の TE 飽和フェノールを加え、穏やかに転倒混合し、遠心分離した。その上清に等量のイソプロパノールを加えて混和後 遠心によりプラスミドを沈殿した。沈殿に 70 %エタノール 500 μ l を加えて洗浄し、遠心によりプラスミドを沈殿後、真空乾燥した。このプラスミドを適量の TE 溶液に溶解し、その後の実験に用いた。

また、DNA シークエンスおよびエレクトロポレーションには、再度ポリエ

チレングリコール法により精製した。前述のプラスミド DNA 50 μ l に PEG 溶液 (13 % ポリエチレングリコール 8000, 1.6 M 塩化ナトリウム) を 50 μ l 加え、穏やかに攪拌後、氷上にて一時間静置し、20 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離してプラスミドを回収した。このプラスミドに 500 μ l の 70 % エタノールを加えて洗浄後、遠心分離し、沈殿プラスミドを真空乾燥後、TE 溶液 50 μ l に再溶解し、実験に供試した。

4. イネもみ枯細菌病菌からのゲノム DNA の調製法

イネもみ枯細菌病菌野生株は King's B 培地 10 ml で、37 $^{\circ}$ C、120 rpm 一晩振盪培養後、遠心分離して集菌した。沈殿菌体を 1 ml Solution I (50 mM グルコース, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) に懸濁し、1 mg リゾチームを加え 37 $^{\circ}$ C、10 分間処理した。その後 10 % SDS 50 μ l 加え室温で 5 分間静置して菌体を分解し、10 mg/ml Proteinase K を 100 μ l 加え 55 $^{\circ}$ C にて一時間処理した後、等量の 2 \times CTAB 溶液 (2 % 臭化セチルトリメチルアンモニウム, 1.4 M 塩化ナトリウム) を加え、65 $^{\circ}$ C、30 分放置した。これに、等量の TE 飽和フェノールを加え、穏やかに転倒混合後、遠心分離した。ゲノム DNA を含む上清を中間層をとらないように新しいチューブに移した。この溶液に、等量の PCI 溶液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール = 25 : 24 : 1) を加えて混合後、DNA を遠心分離した。その上清を新しいチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて混合後、遠心沈殿した。この DNA に 70 % エタノール 1 ml を加えて洗浄後、遠心沈殿し、ゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA は適量の TE 溶液に溶解し、以降の実験に用いた。なお、RNA

の混入が激しいときは、RNase A 1 mg/ml を 1 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C 30 分間の RNase 処理を行った。その後、等量の TE 飽和フェノールを加え、遠心分離後、その上清に等量のイソプロパノールを加えて、遠心分離によりゲノム DNA を沈殿させ、さらに 70 %エタノール 500 μ l を加えて洗浄し、遠心分離によりゲノム DNA を沈殿後、真空乾燥した。このゲノム DNA を適量の TE 溶液に溶解し、その後の実験に用いた。

5. 制限酵素処理

使用した制限酵素は全て宝酒造から購入した。挿入断片およびベクターの制限酵素処理には、DNA 溶液 (0.5 μ g/ μ l) を 1 から 3 μ l、DNA 量の 5 倍ユニットの制限酵素を用いて、至適温度にて、1 時間以上反応させた。

6. ライゲーション

ライゲーション反応には Ligation High (東洋紡績) を使用した。ベクターと挿入断片との DNA 混合液に、その半量の Ligation High を加え、穏やかに攪拌した後、16 $^{\circ}$ C にて 1 時間、もしくは 4 $^{\circ}$ C にて一昼夜反応した。またエレクトロポレーション法により大腸菌へ導入する場合は、ライゲーション反応終了後に、前述のフェノール、エタノールによる精製を行った。

7. 大腸菌への形質転換

大腸菌の形質転換は主に Hanahan 法 (Hanahan, 1983) を改変した PIPES バッファーを利用する熱処理法 (Inoue et al., 1990) で行った。高効率を要する

場合、もしくは巨大プラスミドの場合は、Gene Pluser II (バイオラッド・ラボラトリーズ) によるエレクトロポレーション法を用いて行った。エレクトロポレーションの条件は付属のマニュアルに従った。形質転換した大腸菌は所定の抗生物質を含む LB 固形培地で 37 °C 一晩静置培養し選抜した。

8. サザンハイブリダイゼーション

プローブの作成には BcaBEST DIG Labeling Kit (宝酒造) を用いてジゴキシゲニン標識デオキシウリジン三リン酸をランダムプライマー法により標識した。キットの方法に従って鋳型となる DNA 断片は 1 μ g を用い、5 時間反応を行い、その後 EDTA を 150 mM になるように加え反応を停止させ、プローブを調製した。

サザンハイブリダイゼーションはゲノムもしくはプラスミド DNA を任意の制限酵素で切断後、アガーローズ電気泳動を行った。このゲルを変性溶液 (3 M NaCl, 0.4 M NaOH) で 30 分間処理後、中和溶液 (3 M NaCl, 8 mM NaOH) で 30 分処理をした。その後ブロッキングバッファーとして 20 \times SSC (333 mM クエン酸ナトリウム、333 mM NaCl) を用いて G キャピラリーブロッター (アトー) 装置による下降式パッド法にて、ナイロンメンブレン Hybond-N+ (アマシャムバイオサイエンス) に DNA を一晩プロットした後、UV クロスチャンバー (バイオラッド・ラボラトリーズ) にて UV クロスリンクを行い、DNA を固定した。この DNA をプロットしたメンブレンをシールドパック内でハイブリダイゼーションバッファー (5 \times SSC、1 % Blocking 試薬、0.1 % N-ラウリルサルコシン、0.02 % SDS) に浸し、68 °C で約 1 時間インキュベーション

ョンした後、DNA プローブを加え、68 °Cで一晩インキュベーションすることによりハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを2×SSC (0.1 % SDS 含有) で5分間、2回洗浄後、再度0.1×SSC (0.1 % SDS 含有) で68°C、15分間、2回洗浄した。プローブの検出は、アルカリフォスファターゼ標識抗-DIG 抗体を使用した酵素免疫測定法(ロシュダイアグノスティックス)により、5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)、と nitro blue tetrazolium salt (NBT) (ロシュダイアグノスティックス) の発色反応によって行なった。Buffer 1 (0.1 M Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl) でメンブレンを1分間洗浄後、Buffer 2 (Blocking 試薬を1%含む Buffer 1) で30分間インキュベーションした後、抗 DIG-AP 標識抗体を加えた Buffer 2 で30分間インキュベーションした。メンブレンを Washing Buffer (Tween-20 を含む Buffer 1) 中で15分間、2回洗浄し、未結合抗体を取り除き、Buffer 3 (100 mM NaCl、50 mM MgCl₂·6H₂O を含む 100 mM Tris-HCl pH 9.5) で2分間平衡化し、約1ml の発色溶液(0.55mM NBT および0.4 mM BCIP を含む Buffer 3) 中で暗冷下に数時間静置し、バンドを検出した。

9. PCR 法

本実験に用いた PCR 用プライマーは表 3 に示した。プライマー濃度を 20 pmol、鋳型 DNA を 20 ng から 100 ng、dNTP 濃度を 200 pmol および添付 PCR buffer により最終 10 μ l となるように反応液を作成し、ExTaq DNA polymerase (宝酒造) を 2.5 U/100 μ l になるように加え反応を行った。熱変性温度 94 °C

表 3. 供試 PCR プライマー

プライマー	配列 (5' -3')
gts1	GAAATCGAGTGGCTGA
gts2	CAGCTGAAAGAAACGCAC
gts4	CGAACGTCGAAACTCGCGAG
gts5	ACTGGCGCAAGCTGTACCA
gts6	CGATTCACCCTTCCCTACCTCGC
gts9	GACGTCAGGGAAGGGGATTTAGCC
lux	TAGCACGCAAAATAGATGTCACTCC

で2分間行い、その後熱変性を94℃、30秒、アニーリングを50℃、30秒、伸長反応を72℃、1分で30サイクル行い、最後に伸長反応を5分間行った。

10. 塩基配列の決定と解析

DNAの塩基配列には、ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いた ABI Model 373S DNA Sequencer、もしくは Thermo Sequenase cycle sequencing kit (アマシャム バイオサイエンス) を用いた Li-COR Model LIC-4200L(S)-1 (アロカ) で分析した。シーケンスデータは ABI PRISM™ Sequencing Analysis Software Ver. 2.1.1 もしくは Base ImageIR Ver. 4.0 (アロカ) で解析し塩基配列を決定した。

DNA 及びアミノ酸配列の解析には DNASIS Ver. 3.5 (日立ソフトウェアエンジニアリング) を利用し、系統樹の作成には Clustal X を用いた (Thompson et al. 1994)。ホモロジー検索は National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST (Altschul, et al., 1990; Altschul et al., 1997) の検索システムで行った。

11. 遺伝子破壊用ベクターの構築

選抜マーカー遺伝子を調節するために、Tn5 を含むスーサイドベクター pJB4JI から Km 耐性遺伝子を含む *HindIII-SmaI* の 1.3 kb 断片を切り出し、*SmaI* サイトに *HindIII* リンカーを結合させ、ベクター pCU18 の *HindIII* サイトへ導入し pR2YE を構築した。これを大腸菌で増殖後、Km 耐性遺伝子を含む 1.3 Kb *HindIII* 断片を切り出した。一方、IS1417 配列破壊用のベクターの構築には、

pUC18 上の IS1417 配列を含む 2.6 Kb 断片中の *Hind*III サイトに、上記 Km 耐性遺伝子を含む DNA 断片を挿入し、破壊ベクター pMY402 を作成した。なお、ベクター側にも *Hind*III サイトが存在するため、プラスミドを部分分解して IS1417 配列の *Hind*III サイトに挿入した。

また、IS1417 下流の ORF 破壊用ベクターは、ORF 内にある *Eco*RI-*Pst*I DNA 断片を切り出し、pUC18 に導入後、ベクター中の *Hind*III サイトに上記 Km 耐性遺伝子を含む *Hind*III DNA 断片を挿入して、破壊ベクター pMY403 を構築した。

12. イネもみ枯細菌病菌の形質転換

イネもみ枯細菌病菌野生株を King's B 液体培地 1ml で 37 °C にて一晩振盪培養後、この培養液 100 μ l を King's B 液体培地 10ml に植菌し、再度 37 °C で OD₆₀₀ = 0.6 まで振盪培養した。10 分間氷上で冷却後、培養液を滅菌遠心管 (15 ml) を用いて 4°C で集菌し、菌体を 5 ml の冷超純水に懸濁し、遠心洗浄後、1 ml の 10 % グリセロールに懸濁した。これを遠心集菌し、最終的に 500 μ l の 10 % グリセロールに懸濁後、100 μ l ずつ分注した。これに 2 μ g の精製プラスミド DNA を加え、エレクトロポレーション法で形質転換した。形質転換体は所定の抗生物質を含む King's B 固形培地で 37 °C 一晩静置培養し選抜した。

13. イネもみ枯細菌病菌からの RNA 抽出法

イネもみ枯細菌病菌の全 RNA は Acid Guanidium Phenol Chloroform 法

(Sambrook et al., 1989) により抽出した。King's B 液体培地 1 ml で、37 °C、一晩振盪培養後、その 100 μ l を同培地 10 ml に植菌し、37 °C、20 時間振盪培養した。培養菌体を遠心集菌後、菌体に、Denaturing solution (4 M グアニジンチオシアネート、25 mM クエン酸ナトリウム pH 7.0、100 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 % N-ラウリルサルコシン) 500 μ l、2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) 50 μ l、酸性フェノール 500 μ l、クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) 100 μ l を添加して充分混合後、氷上に 15 分静置し菌体を溶解した。この溶液を 4 °C で 15 分間遠心し、回収した水層に等量のイソプロパノールを加えて -20 °C で 10 分間冷却後、4 °C で 10 分間遠心分離し、RNA 分画をペレットとして得た。この RNA 分画に 300 μ l の Denaturing solution を加えた後、300 μ l のイソプロパノールを加え、-20 °C で約 30 分冷却後、再度 4 °C で 10 分間遠心し、RNA を沈殿した。このペレットを 1 ml の 75 % エタノールで洗浄後、RNase-free TE に溶解し、RNA サンプルとした。

14. Reverse Transcriptase (RT) -PCR 法

逆転写反応は RNA 1 μ g に 10 mM dNTP 2 μ l、Oligo(dT)₂₀ 1 μ l、RNase-free H₂O で総量 10 μ l に調節し、80 °C で 5 分間処理し、RNA 変性した。変性 RNA にプロメガ製の 200 units/ μ l M-MLV RT Enzyme (RNase H⁺) 1 μ l、および 5 \times RT buffer 4 μ l、RNase Inhibitor 1 μ l (20 units/ μ l)、RNase-free H₂O 4.5 μ l を加え、42 °C で 90 分間行った。反応は 85 °C、5 分間熱処理して終了し、一本鎖 cDNA を得た。

この cDNA 溶液 1 μ l を Fast Start Taq DNA Polymerase (ロシュダイアグノスティ

ックス)を用いてPCR反応(熱変性を94℃で30秒、アニーリングを50℃で、30秒、伸長反応を72℃で1分、30サイクル)を行った。PCR産物は1.2%アガロースゲル電気泳動により確認した。

15. 毒素の抽出と精製

イネもみ枯細菌病菌野生株をKing's B 液体培地1 mlで37℃で一晩振盪培養後、この前培養液1 mlを新しい同培地100 mlに植菌し、37℃、3日間振盪培養した。この培養液を遠心により菌体を除去した後、上清中の毒素を等量のクロロホルムで3回抽出した。クロロホルム抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮・乾固後、得られた残渣を少量のメタノールで溶解した。このメタノール粗毒素液を残渣の約20倍量のシリカゲル(Kieselgel 60; 230-400 mesh, ASTM, メルク製)を充填したカラムに吸着後、クロロホルム：メタノール=9：1液を用いて毒素を溶出した。溶出液は約5mlずつ分画し、各分画をシリカゲルプレート(Kieselgel 60; F254, メルク製)にスポットし、クロロホルム：メタノール=9：1で展開後、366 nm UV照射でRf 0.4付近にスポットを示す分画を検出・回収した。この回収液をロータリーエバポレーターで濃縮・乾固後、少量のメタノールに溶解し、毒素液として4℃に保存した。

16. 毒素産生能と毒素耐性試験

簡易毒素産生能の検定には、イネもみ枯細菌病菌の野生株および変異株をCaPG固形培地に移植し、37℃で2日間培養後、培地の黄色化で確認した(松

田, 1990)。毒素の定量は、King's B 液体培地で 37 °C、20 時間培養後、遠心分離により菌体を除去し、その上清に等量のクロロホルムを加えて毒素を抽出した。クロロホルム抽出液はメンブレンフィルター (PTFE 0.45 μm) を通して残渣を取り除き、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。HPLC は Waters 600E を使用し、カラムは AQUASIL SS752-N(B) (センシユー科学) を用い、検出波長は 260 nm、溶離液は酢酸エチル : メタノール (95 : 5)、毎分 3 ml の流量で溶出した。

また、イネもみ枯細菌病菌の毒素耐性試験は前培養液をトキシフラビン 1 $\mu\text{g/ml}$ あるいは、5 $\mu\text{g/ml}$ 含有 King's B 培地に植え継ぎ、20 時間培養後の菌体の増殖を確認した。また、トキシフラビン 5 $\mu\text{g/ml}$ を加えた King's B 固形培地に画線培養し、20 時間後における生育の有無を確認した。

17. 発病試験

イネの種子は 70 %エタノールで 30 秒間、2 %次亜塩素酸で 40 分間滅菌後、滅菌水に浸し 28 °C で催芽を行った。イネもみ枯細菌病菌またはその変異体を一晩培養し、その培養液を 4×10^8 cfu/ml になるように希釈後、催芽種子を 32 °C、3 時間浸漬接種した。風乾後、素寒天培地上にて 35 °C で育成し、3 週間後に病徴の発現を観察した。

結果

1. 病原性欠損変異株 No. 19 に対する相補ゲノム DNA 断片の解析

イネもみ枯細菌病菌変異株 No. 19 の毒素産生能および病原性の欠損は、野生株ゲノムライブラリーのコスミド pNP147 を導入することによって回復されることから、pNP147 中の約 25 kb の挿入断片を解析した。挿入断片を各種制限酵素で切断し、イネもみ枯細菌病菌ゲノム上の Tn4431 挿入周辺部分を含む DNA 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結果、*EcoRI* で切断した約 2.6 kb DNA 断片に強いシグナルが検出された。そこで、この *EcoRI* 2.6 kb 断片をクローニングし、塩基配列を決定したところ、転移因子である大腸菌の IS2 配列と高い相同性を示す 2 つの重なる ORF (ORFI および ORFII) が存在した。図 3 に示すように、2 つの ORF は 963 番目から始まる AAAAAAA 部位にて -1 のフレームシフトが起きることによって、結果として 1 つの ORF として翻訳され、トランスポザナーゼ酵素となることが推測された。さらに、この ORF 内にはトランスポザナーゼに特有の W_{xx}D、N3 および C1 モチーフ、また 5' 末端および 3' 末端には逆方向反復配列が存在することから、この間の 1336 bp の DNA 配列が、可動 DNA 部位として働くことが考えられた。その後、この IS2 様配列は IS1417 (Hasebe et al., 1998; Hasebe and Iida, 2000) と同一であることが確認された。

次に、IS1417 と毒素産生能との関係を明らかにするため、コスミド pNP147 の 25 kb 挿入 DNA 断片における IS1417 の周辺遺伝子について解析を行った。25 kb DNA 断片中の IS1417 における *HindIII* サイトより上流および下流に位置

541 AACATGACCGTTGGAGCAGCCCCCTGAAAACACCGGACACAGTCACCCACTTACAATAACG
-35 -10

601 GGTAGGTATAAGACCGTGTTTTGGACTCACACCAGGCAGGAAGTGAATGGACGTGTGACG
S-D M D V L T **ORFI**

661 GGCCCGGAGCGTCGGCGGGCTGGACGGCAGAGCAAAAGCTGGCGATGGTTCGCGAGAGT
G P E R R R R W T A E Q K L A M V R E S

721 TTCGAGCCGGGAAATCGGTTTCGATGGTAGCGCGCCAGCACGGCGTGAATCCGAACCAG
F E P G K S V S M V A R Q H G V N P N Q
ヘリックスターンヘリックスモチーフ

781 CTCTTTCCTACTGGCGCAAGCTGTACCAGGATGGAAGCCTGTTCGGCGGTCAAGGCTGGCGAG
L F H W R K L Y Q D G S L S A V K A G E

841 GAAGTGGTTCGGGCTCGGAGTTGGCCGACGGCTCAAACAGATTTCGCGAGTGCAGCGC
E V V P A S E L A D A L K Q I R E L Q R

901 ATGCTCGGCAAGAAGACGATGGAGAACGAGATTCTTCGCGAGGCTGTGGAATACGGCCGG
M L G K K T M E N E I L R E A V E Y G R

961 GCAAAAAATGGATAGCGCACTCGCCATCGTTGCCGGAGGACAGCCAGTGAAACTGGTCT
A K K W I A H S P S L P E D S Q *
K K M D S A L A I V A G G Q P V K L V C
ORFII

1021 GCGAAGTCCTCGGCGTGTTCGGCTCGAACGTATCGGCACGCAGGTCGCGGAGGCGACTT
E V L G V S R S N V S A R R S R E A T W

1081 GCGCGACGGGCGGACGCCAGATCGACCCACGATGCACCGGTGGTCGAGGCTATTGAAC
R D G R Q P R S T H D A P V V E A I E R

1141 GGGTTATCAGCGACTTGCCAGCTACGGATATCGACCGGTATGGGGGACGTTGCGCCGCG
V I S D L P S Y G Y R R V W G T L R R E

1201 AGCGTATCGCGGGGACAGGCACCGCTGAACGCCAAGCGCATTACCGCGTAATGCGCA
R I A A G Q A P L N A K R I Y R V M R T

1261 CGCATGGCCTGCTGATGCAACGCAGAGCGGCACCGGTTTCGGCCGACGCGCCGTCACGATG
H G L L M Q R R A A P V R P Q R R H D G

1321 GCAAGGTTTCGGTGGAGCGCAGCAATCAGCGCTGGTGTTCGGACGGCTTCGAGTTTCGCT
K V A V E R S N Q R W C S D G F E F R C
WxxDモチーフ

1381 GCGACAACGGCGAGCCGTTGCGCGGTGACGTTTCGGCTCGACTGCTGCGACCCGGAAGCGA
D N G E P L R V T F A L D C C D R E A M

1441 TGAGCTGGGCGGCCACGACGGCCCGCCATAGCGGCGACATCGTGCAGCGACGTGATGCTGG
S W A A T T A G H S G D I V R D V M L A

1501 CTGCGGTGGAAGCCGGTTTGGGGATGTGCTGCATACCGAGTCCGAAATCGAGTGGCTGA
A V E S R F G D V L H T E S E I E W L S

1561 GCGACAACGGCTCGGGCTATACGGCCGAGGAGACGCGTCAGTTTCGGCGCTGCTCGGCC
D N G S G Y T A E E T R Q F A A L L G L
N3モチーフ

1621 TGAAGCCGTTGACACGCCGGTGTGCAGCCCGCAGAGCAACGGCATGGCGGAAGCTTCG
K P L T T P V C S P Q S N G M A E S F V
C1モチーフ

1681 TGAAGACCATGAAGCGGATTACGTCGCTATCATGCCGAAGCCGGACGCAGCGACCCGCG
K T M K R D Y V A I M P K P D A A T A A

1641 CCAGGAATCTGGCCATCGCATTCGAGCACTACAACGAAAAGCATCCCCATAGCGCGTTGA
R N L A I A F E H Y N E K H P H S A L K

1801 AGTACCGCTCGCCTCGCGAGTTTCGACGTTTCGACGGATTTCAGCAACCTAAGTGGGTGCCG
Y R S P R E F R R S T D S A T *
TAAGTGGGTGCCG

1861 TGTCTGAGTTACGGGGCAACTCCAAACCGTTTGTAGTTT.....

図3. pNP147中の2.6 kbゲノムDNA断片の塩基配列とIS1417の存在 (541-1900)

-35,-10はプロモーター配列、S-Dはシャインダルガノフ配列、太字のDNA配列は推定のフレームシフト部位、下線部はトランスポゼースモチーフ、*は終止コドン、四角内の塩基配列はIS1417特有の逆方向反復配列

する *Hind*III サイトまでの、それぞれ 6.5 kb、7 kb についてサブクローニングを行い、それらの塩基配列を決定し、その主要部分を図 4-1 から 4-7 に示した。図 4-2 から 7 に示すように、IS1417 の下流の 7 kb 断片中には、3 の ORF が見出され、それぞれ *bgp1*, 2, 3 と名付けた。*bgp1* (図 4-2, -3 の 7314 番目から 8261 番目) は IS1417 の約 530 bp 下流に、逆方向で存在し、948 bp、315 アミノ酸からなることが同定された。このアミノ酸配列はデータベース検索により、*Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 株の内生プラスミド pRA2 にコードされている *repA* (accession number: AAB70929) と部分的に高い相同性が認められた (図 5)。*bgp2* (図 4-3, -4 の 8630 番目から 9799 番目) は *bgp1* から下流約 360 bp に位置し、*bgp1* と同方向の 1170 bp、389 アミノ酸から構成されていた。そのアミノ酸配列は、表 4 に示すように、*Mesorhizobium loti* の未同定タンパク質と約 40% の相同性があり、その他数種のタンパク質とも相同性が認められたが、いずれも機能未知のタンパク質であった。また、*bgp3* (図 4-5, -6, -7 の 11081 番目から *Hind*III 末端) は、*bgp2* から下流 1282 bp の位置に、*bgp1* および *bgp2* と同方向に存在したが、全長をクローニングすることはできなかった。しかし、その C 末端のアミノ酸配列は、様々な細菌タンパク質の膜結合領域と相同性が認められた。これらタンパク質の C 末端アミノ酸 200 残基を比較したところ、*Xylella fastidiosa* の autotransporter adhesin、*Neisseria meningitidis* の outer membrane protein、*Burkholderia fungorum* の autotransporter adhesin と比較的高い相同性が認められた (図 6)。

一方、IS1417 上流の 3099 番目から 3766 番目には、図 7 に示すように転移因子 IS1418 (accession number: AB010572) と相同性の高い領域が存在した。し

GCCATCGTCATTGGCCGTCCTTTCAATTGATCAGTAATCAACAGGCTTCGCTGTCATGAT 5280
GGAATGAACGATCACTTTGCACTGCCAGTGGTGTGTAAGCGGGTTGGACCCGCGTGGG 5340
GCGTACCTGACTAAGCGCTGGGGGCGTATCAATTTACCCCGACCGCCGAACGAGGTCTC 5400

ACGCGCGTCTTTTCATCAGGGTCCGGGCCGTTGGTCCAACATGACCGTTGGAGCAGCCCC 5460

CTGAAACACCCGGACACAGTCACCCACTTACAATAACGGGTAGGTATAAGACCGTGTTTT 5520

IS1417 トランスポザーゼ

GACTCACACCAGGCAGGAAGTGATGGACGTGTTGACGGGCCCGGAGCGTCGGCGGCCGCTG 5580
M D V L T G P E R R R R W

GACGGCAGAGCAAAAGCTGGCGATGGTTCGCGAGAGTTTCGAGCCGGGAAATCGGTTTC 5640
T A E Q K L A M V R E S F E P G K S V S

GATGGTAGCGGCCAGCACGGCGTGAATCCGAACCAGCTCTTTCACTGGCGCAAGCTGTA 5700
M V A R Q H G V N P N Q L F H W R K L Y

GTS5プライマー

CCAGGATGGAAGCCTGTTCGGCGGTCAAGGCTGGCGAGGAAGTGGTTCGGCCCTCGGAGTT 5760
Q D G S L S A V K A G E E V V P A S E L

GGCCGACGCGCTCAAACAGATTCGCGAGCTGCAGCGCATGCTCGGCAAGAAGACGATGGA 5820
A D A L K Q I R E L Q R M L G K K T M E

GAACGAGATTCTTCGCGAGGCTGTCTGAATACGGCCGGGCAAAAAAATGGATAGCGCACTC 5880
N E I L R E A V E Y G R A K K M D S A L

GCCATCGTTGCCGAGGACAGCCAGTAAACTGGTCTGCGAAGTCCTCGGCGTGTTCGCGC 5940
A I V A G G Q P V K L V C E V L G V S R

TCGAACGTATCGGCACGCAGGTCGCGCGAGGCGACTTGGCGCGACGGGCGGCAGCCCAGA 6000
S N V S A R R S R E A T W R D G R Q P R

TCGACCCACGATGCACCGGTGGTTCGAGGCTATTGAACGGTTATCAGCGACTTGCCCAGC 6060
S T H D A P V V E A I E R V I S D L P S

TACGGATATCGACGCGTATGGGGGACGTTGCGCCGCGAGCGTATCGCGGCGGGACAGGCA 6120
Y G Y R R V W G T L R R E R I A A G Q A

CCGCTGAACGCCAAGCGCATTTACCGCGTAATGCGCACGCATGGCCTGCTGATGCAACGC 6180
P L N A K R I Y R V M R T H G L L M Q R

AGAGCGGCACCGGTTTCGGCCGCGAGCGCCGTACGATGGCAAGGTTGCGGTGGAGCGCAGC 6240
R A A P V R P Q R R H D G K V A V E R S

AATCAGCGCTGGTGTTCGACGGCTTCGAGTTTCGCTGCGACAACGGCGAGCCGTTGCGC 6300
N Q R W C S D G F E F R C D N G E P L R

GTGACGTTTCGCGCTCGACTGCTGCGACCGGAAGCGATGAGCTGGGCGGCCACGACGGCC 6360
V T F A L D C C D R E A M S W A A T T A

GGCCATAGCGGCGACATCGTGCAGCGACGTGATGCTGGCTGCGGTGGAAAGCCGGTTTGGG 6420
G H S G D I V R D V M L A A V E S R F G

GTS1プライマー

GATGTGCTGCATACCGAGTCCGAAATCGAGTGGCTGAGCGACAACGGCTCGGGCTATACG 6480
D V L H T E S E I E W L S D N G S G Y T

GCCGAGGAGACCGCTCAGTTTTCGGCGCTGCTCGGCCGTAAGCCGTTGACCACGCCGGTG 6540
A E E T R Q F A A L L G L K P L T T P V

図4-1. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (5221-6540)
四角はIS1417配列、短い矢印は遺伝子のORFの方向、太字はIS1417の推定挿入点、長い矢印はプライマー部位

IS1417 →

*Hind*III

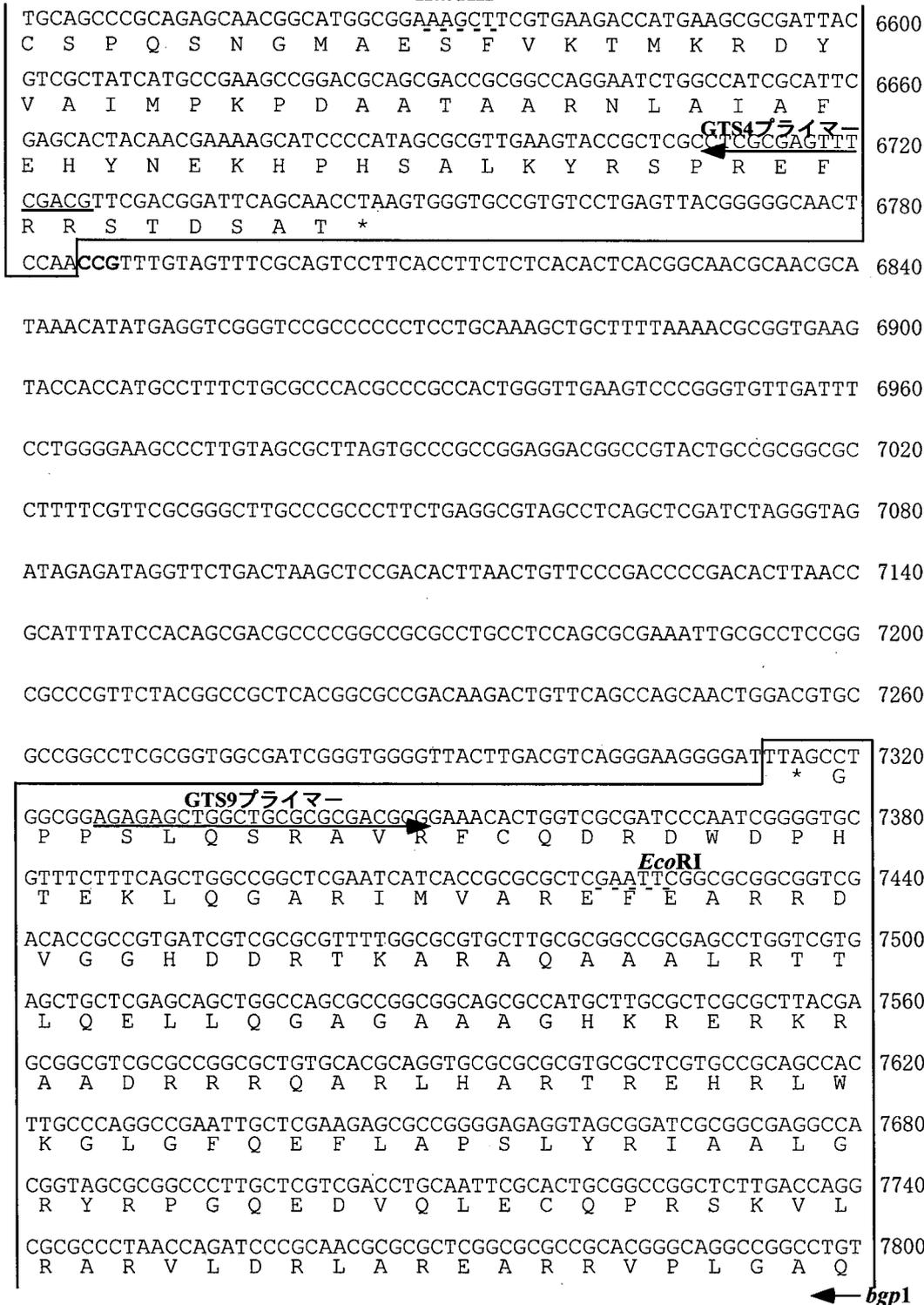


図4-2. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (6541-7800)
 四角はIS1417配列および*bglI*遺伝子、短い矢印はORFの方向、*は終止
 コドン、太字はIS1417の推定挿入点、点線は制限酵素サイト、長い矢印
 はプライマー部位

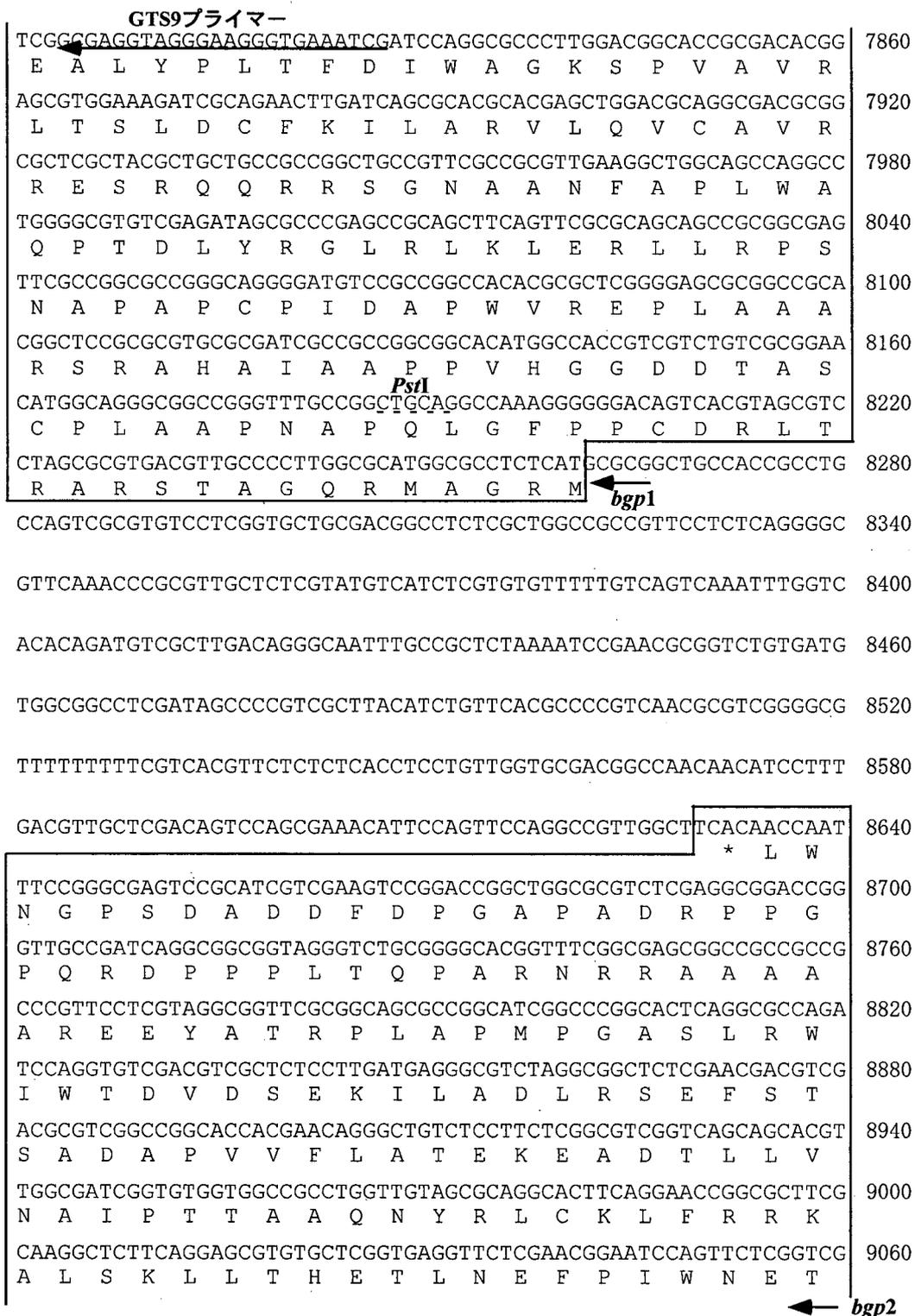


図4-3. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (7501-9060)

四角は**bgp1**および**bgp2**遺伝子、短い矢印は遺伝子のORFの方向、
*は終止コドン、点線は制限酵素サイト

```

TCAGCATCATCGAGACTTCATGAACCGTCGCGGTGCCGCTTGCAGAGACGCTCGCCGTGG 9120
T L M M S V E H V T A T G S A S V S A T
CGATCACGATCAGATGCGTGCCTTCGGTGTGGCCGACATTTTCGAGCTCGGCCTTGAAGA 9180
A I V I L H T G E T S A S M E L E A K F
CCTTCTCGATTTCGCTTTTTGGTGGCTTCGTCGAGCATGAGGCCGAAGCGGGGCAGGTGTT 9240
V K E I R K K T A E D L M L G F R P L H
TGATCACCAGCTTGAAGCCGAAGCGCGCGGTGGCGATCTCCTTGAGTTCGCCAATCACGA 9300
K I V L K F G F R A T A I E K L E G I V
GGATGTAGTGGGGCTTACCGCCCTCGGACTGGCTGATGCGCGGAGATGCGCCGCGCGGC 9360
L I Y H P K G G E S Q S I R A L H A A R
GCTGCTCGATCTGGTCCTCTTGGTCGAGTACGAACGCTTCGGGGATGTAAAGCAGGTTCGG 9420
R Q E I Q D E Q D L V F T E P I Y L L D
TCAGGTCGAACTTCTTGGACTGCTTGCCGGCCGCCGCTTCAACAGTTCGCGCCGCACGA 9480
T L D F K K S Q K G A A A K L L E R R V
GGCCCCAACCGCGCTTGCCTGCCATCGCCGGCGTCCAGCGATTGAGGCAGGCTTGTCTCC 9540
L G W G R K G A M A P T W R N L C A Q E
ACAGGTAATGAAGCAGGCCGCGCAGCGTGAGCTTCTTGCCATCGGCCTTCACGCTTTCCG 9600
W L Y H L L G R L T L K K G D A K V S E
GTTCCGCGCCGACGGTTCGGGCATCTGGCGCAAGGGCCCTTGCCAGCGGGAAGCCGA 9660
P E A G S P E P M Q R S P G K A L P F G
ATTTACGCGTCACCAGGCCGCTGTCCGGTCTCGACGATGGCGCTGCCGTCGACGTCGC 9720
F K L T V L G S D P D E V I A S G D V D
CGTAGCCGCTCAGGCCCGCCGGCGCCTCGTAGGAATCGCACATCGGGTCCACCGAGTGCT 9780
G Y G S L G A P A E Y S D C M P D V S H
GCCGGGCGGTGCCAGGCATACGCTTGACGATGAAACGATCTTTCGAAGCGGGCGATGTACA 9840
Q R A T G P M ← bgp2
TCGGAATGCCCGGGCTCTGACAGAGGCAGAGCGGGCGTTTTCTTCTCGTTCGTCGCGGCCG 9900
GCAGCCGCGCCAGAACTGTTGCTCGCGCCGTGCAATTCCTCGCCATCCAGTTCGTATCG 9960
TTGCATGGGGTTCTCCTGGTTCAGCGTGCGGTGCGTGGCGTGGGGCTGCCGCGCGTGGTC 10020
ATGGCGAGCGCGCGGTGCGTATCGAGGCCGCGCATGTAGCCGGTCAGGTTGCTCGATAAG 10080
TCCGGCCGAACGCGCGTATCGACGTGAGCGTCGGGCGCACGGCGGGTGCCGGCGAGCGAG 10140
TACGCCCCCCATTTCGGCCCCGAGTGCAGATCGAAGCGGGCGAGGGCGACGTCGCAAGAC 10200
AGCAGTTGGCGCATCGCTGAGACGGGCACGCGCAGCTTCCCGCGAGGCGGCTGGTCGTA 10260
TAGGTGACGCCTGGCCTCATCGTCGCGGCCACCTCGGCGAACGTGAGGTTTGCCCGAGCG 10320
GATTTTCGTCGCGCGGCGCGTTCGTGGCCGGTCCGGAGTTGCGTGGGTTCGTGTTGGTTGCGT 10380
GTCATGGCGTCCGATCCTCAGTCCGAGTCCGGGGGAACCGCGCCGTAAGTCGTACCGCGC 10440
GCGAGGTTCGGCGAGCACGCGCCGAGCGGGCGGTGACCGTCAGCAGATCCATGCTGACCAAC 10500

```

図4-4. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (9061-10500)
 四角は*bgp2*遺伝子、短い矢印は遺伝子のORFの方向

CCGTCCACCCCATAGGGGTTTCGTGACCCACACGCCCTCGTCGCTCACGTAGTCAAAGATG 10560

TGCCCCGTGGACGTGCACAGACTCGCCGGCGGCCAGCGTCTTAACGAATTCATCTGGCGTG 10620

GGCAATCCAAGCGCTGCCAGGGCGCCCGCGGGCATCGCCGCCTCAGTAGCCTCTCGCCGC 10680

TCCGCCTCGGCACGCTGCGCGTCCATCTCGGCTTGACCTCAGCGAGTGCCTCTCCAGT 10740

TCTGCCTGCTCGGCGGCTTGCTCGCACTGAGTTCTGTTGATCGCGCATTGAATGAGTCA 10800

CGAAGCGTCGGCACGTGGCAAACAGGTGGGGGCACGTGAGTTCGTGGCCCCGATCAAC 10860

ACCAGATCGCGTGCAGATCCTCTGCTTGCTCGCATGCGTGTTGACAAGTCTCTGCCAC 10920

GCAGGTGAGCCGTAGTCGGTCGTGCAGATCGCCATCGCGTAATCGACACGGGCCTGCAGG 10980

GCACGCGCAAATGCGATCGGCACGCCGTTACGAGGGGGCGCCACGGTGACGCCGCTGGTG 11040

AAGTGGGTAAAGCGGGTGGCTTGCATGTGGTCTCCTTCCGTTACCAGGTGTAGCCGGCGC 11100

* W T Y G A

CGAAGCCGGCCGCGACGGTGCCGCGCGAGTTCGTGAGCCGCTTGCCCTTGAGGACCCACC 11160

G F G A A V T G R S N T S G S A K L V W

GGCCCGGTAGGTTCGAGACGCCACGGCCATGGCCGACTGGCCGGCATAGGTGCCGCCGC 11220

R G A Y T S V G V A M A S Q G A Y T G G

CGATTGCGACCATGGTCTTGCCCGGGGCGGGCGCTTGAGGGAGGCTCGCCATCGCCACGG 11280

G I A V M T K G P A P A Q P L S A M A V

CCGCCGCGATGCCGCCGTTGGCGTTCGCGCCGGTTCGTGCTCGATCTGGTTGGCCAGGCCCG 11340

A A A I G G N A D R R D H E I Q N A L G

TCACCGAGTCGTTGAGCTGCTGAACGTTGACGGCATCGGTGGGCGCGACGCCCGGCGAGA 11400

T V S D N L Q Q V N V A D T P A V G P S

CGTTGCTGAGGATGCGGGTCATGCCGGTTCGCGCGCTTGCCGATCGACACCGCGTTGTCCT 11460

V N S L I R T M G T A A N G I S V A N D

GGTCCGCGACGGACCCGGCGCCGAGCGCCACGGAGTTCGCGCCCTTGGCGCTCGCGCTGT 11520

Q D A V S G A G L A V S N A G K A S A S

CGCCCAGGGCGACCGATCCGGTGCCCGCGCTGGCGGGCGCCCGCGCCGAGAGAAACGGCTC 11580

D G L A V S G T G A S A A G A G L S V A

GCTCGCCGGAAGCGACCGCGGTGGCACCGATGGCCACGGCATCCGTGCCCGTTGCGACGG 11640

R E G S A V A T A G I A V A D T G T A V

CGCCCGCGCCGGCGCTGTTGAAGGCGGCGTACTTGAGGCTGGCGGGTGCCGCGATCGCGT 11700

A G A G A S N F A A Y K L S A P A A I A

TGGTCTGGCTGAAGCTGGACGGCAGGATGGCGCCGAGCTGGGACGAGAGCGAGGTGATCG 11760

N T Q S F S S P L I A G L Q S S L S T I

← *bgp3*

図4-5. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (10501-11760)
 四角は**bgp3**遺伝子、*は終止コドン、短い矢印は遺伝子のORFの方向

CCGCGGTGTTGGCCGCGAGGATCTGGTTGGTGGCGAACAGCTGGCCGCCGTTGACGGCAT	11820
A A T N A A L I Q N T A F L Q G G N V A	
CGAGACTGCCGGCCGACAGCGCGCCAGCGGCCAGGTTGTGGATGGTCACGGCGGTGCCGG	11880
D L S G A S L A G A A L N H I T V A T G	
CGCCGAGGCCGCCAAGCGTCACGCTGAGCTTGGTTCGGGCCGTCGTAGGCCAGCGCGCTCG	11940
A G L G G L T V S L K T P G D Y A L A S	
AGGCGAGGGTGCCGACCGCGCCGGCGAGCTGCTGCAGCTGACCGACATTGGCCCGCTCGG	12000
S A L T G V A G A L Q Q L Q G V N A A D	
TAACGTCGACGCCGGCGGCCACCCCTGTGATTCGCCTCGGACCGGCCGTCGCCGCCACGT	12060
T V D V G A A V G T I R R P G A T G A V	
CGATGCTCGAGCCGGCGGTGCCGGCGCCGATAGCGAGGGCGGCCGTTGGTCCCGCCGACCT	12120
D I S S G A T G A G I A L A A T T G G V	
GTTGCACGAGGCCGACCGTGC CGGCCGCAAGCTGGCCGCCAGCGCCGAGACGCTCTGGT	12180
Q Q V L G V T G A A L Q G A L A S V S Q	
TGGTCGCGAAGAGCTGGCGGCCGGTGACGGCGTCCGGTCTGGTGGGGGAGAGCGCGGCCGT	12240
N T A F L Q R G T V A D T S T P S L A A	
CGGCGATGTTGGTGAGCGAGACCGCGTGC CGGCCGCCGCAAGGTCACGCGCGTGC GCG	12300
D A I N T L S V P T G A G G F T V R T R	
ATGCGTCGTCTAGCCGATGGAGCCGGCGCCGCCGACCGCCCGCTGAGGGCGTCTGT	12360
S A D D Y G I S G A G A P G G A S L A D	
CAAGCTGCTGGAGGTTGACGGCGTCCGGTGGCGCCAGTGC CGGCCGGCTACGCCCTTCAGTT	12420
D L Q Q L N V A D T A G T G A A V G K L	
GCCGCGCGCCGGCGGTGCCCGCGACATTGATGGCGGGGCCCGGTGCCGCGCCAATCG	12480
Q R A G A T G A V N I A P G G T G A G I	
CGATCGTTCGGTGGCAAGGCCGCTCGCTTGCCGAACGAGACCGACGGTTCCTTCGGCCA	12540
A I T G T A L G S A Q R V L G V T G E A	
GCCCGCCTGCAACGCGGAGAGCGTGGTCTGGTTGCTCGAGACGTCGGTGTCTCAGGGAAT	12600
L G A Q L A S L T T Q N S S V D T S L S	
TGAGAGACTGGGCAGTCGAGTTCGTGAGCGACGACAGCGTCGCGGCAGTGGCGGTGCAAA	12660
N L S Q A T S N T L S S L T A A T A T S	
GATTGCCAATCGCGGTGGCATTGCCCGCATCGCCTGATTGGCGGCATACAGCTGGCGTC	12720
L N G I A T A N A A I A Q N A A Y L Q R	
CGGAGACGGCGTCCGTTACTGCCGACGACAACCGCCATCCGCGACGTTGGTCACGGTGA	12780
G S V A D T S G S S L A G D A V N T V T	
CAGGTGTGCCTACCGCACCGAGCACGACCGGGAATGCGATGCGTCGACATAGCCCACCG	12840
V P T G V A G L V V R S H S A D V Y G V	
CGCCGGCGGCCGAGCCCATCGCGCTGGTCATGCTCTGCACCTGCTGCAGGTTGACTGCAT	12900
A G A A S G M A S T M S Q V Q Q L N V A	
CGGTGGCGCTGGTGC CGGCCGCCACGCCCTGGATCTGCCGGGCCCGCCCGTACCGGTGA	12960
D T A S T G A A V G Q I Q R A G A T G T	
CGTCGACCGCGGTGCCGCCCGTGC CGGCCGCCGACCGTATCGTGCCGGTGCTGGCGCCGC	13020
V D V A T G G T G A G V T I T G T S A G	

← *bgp3*

図4-6. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (11761-13080)
 四角は*bgp3*遺伝子、短い矢印は遺伝子のORFの方向

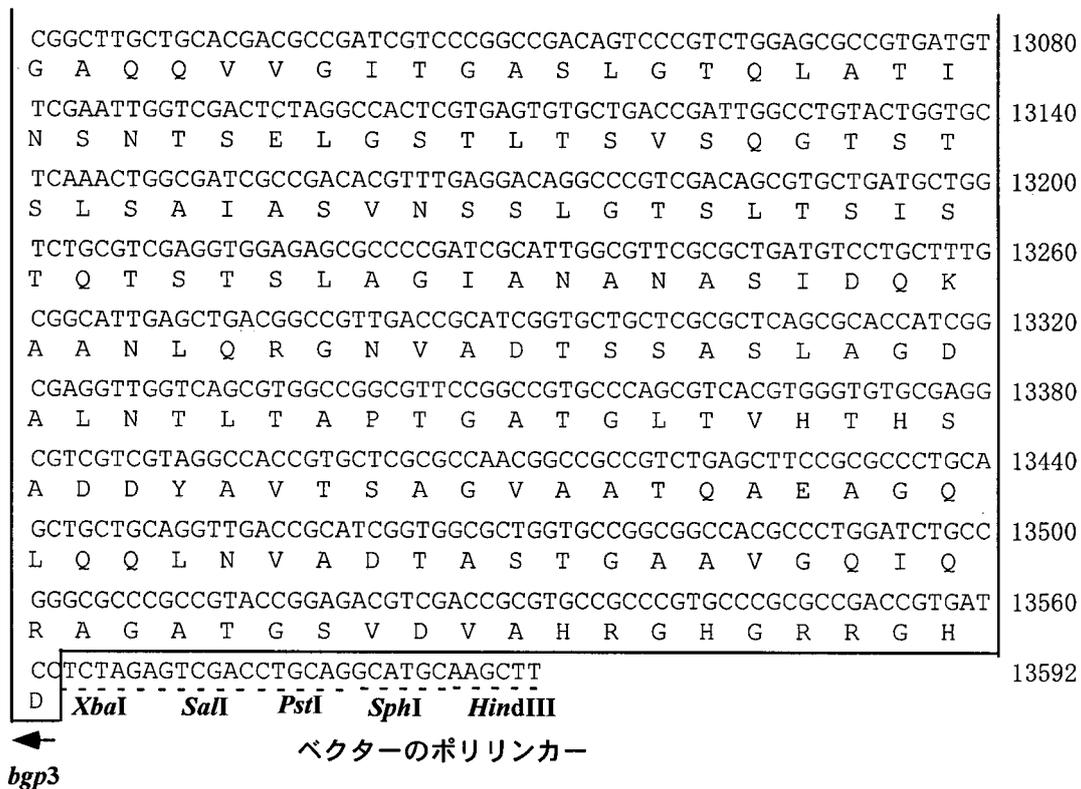


図4-7. IS1417下流のゲノムDNA断片の塩基配列 (13081-13586)

四角は***bgp3***遺伝子、短い矢印は遺伝子のORFの方向、
点線は制限酵素サイト

		10	20	30	40	50
<i>bgp1</i>	VT--RPPFGL	QPANPAALP	SATDDGGHVP	PAAIAHARNR	AAALPERVWP	
<i>repA</i>	MALEKRPY-V	PRVNGGGNY	GHQPESRLS	LIKPTTDKKR	-----	
		60	70	80	90	100
<i>bgp1</i>	ADIPCPAPAN	SPRLIRELKL	RLGRYLDTPQ	AWLPALNAAN	GSRRQORSER	
<i>repA</i>	-----	-PGIILKALQV	RVQOYYGAPK	T-IPSLNAAN	GSKRQORSER	
		110	120	130	140	150
<i>bgp1</i>	RVACQVLRRA	LIKFDIISTL	RVAVPSKGAW	IDFTLPYLAE	QAGLPVRRAE	
<i>repA</i>	REACLRRLTA	IVEITDLASL	RCGVPTQAGF	LSLITLDYIIVE	FTGLHPRRAE	
		160	170	180	190	200
<i>bgp1</i>	RALRDIIVRAR	VKSRPQCEI	QVDEQGPYR	GLAAIRYLSP	ALFEQFGLGK	
<i>repA</i>	RAMADIKRAN	ISVSOPROI	Q--EDGSW-R	GLAAVKAINK	LLFSVEGLGR	
		210	220	230	240	250
<i>bgp1</i>	WLRHERTRAH	LRAQRRRDA	RKRERKYGAA	AGAGQLEQL	TTKLAAQAR	
<i>repA</i>	RLRHERDRAA	KRLAKK---A	AKVGGTLTSW	ARNALVGVNV	IGKGAHAGH	
		260	270	280	290	300
<i>bgp1</i>	AKTRDDHGGV	DRRAE---FE	RAVMIRAGQI	KETHPDWDRD	QCFRVARSQI	
<i>repA</i>	YRPPAPPGSP	PRGVDPESEQ	QARHELLVAL	KTAHPDMTAE	ECNAEADKI	
<i>bgp1</i>	SPP-G*					
<i>repA</i>	RTKLQA					

図5. *bgp1*遺伝子と*P. alcaligenes repA*遺伝子のアミノ酸相同性

網掛け部分はアミノ酸配列の一致を示す

表 4. *bgp2* 遺伝子のアミノ酸配列と相同性を示したタンパク質

タンパク質	微生物	相同性(%)	Accession No.	参考文献
hypothetical protein	<i>Mesorhizobium loti</i>	42	NP_085787	Kaneko et al., 2000
unknown	<i>Rhizobium etli</i>	39	NP_659881	Girard et al., 1991
conserved hypothetical protein	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	37	NP_435741	Barnett et al., 2001
hypothetical protein	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>	36	ZP_00093606	
hypothetical protein	<i>Pseudomonas putida</i>	26	NP_542801	Greated et al., 2002

<i>Salmonella enterica</i>	901	DSVAIGSGSI	AAAENSVALG	TNSVADEANT	VSVGSSTQQR	RITNVAAGVN
<i>Xylella fastidiosa</i>	770	NSVNNSATPI	AAGVDATA G	VGATASGADS	IAMGNK----	-----ASAS
<i>Burkholderia fungorum</i>	637	HAVAMGASAQ	ATGVNAIATG	AGSLAGGNA	TALGAA----	-----ANAG
<i>B. glumae bgp3</i>		DAVAIGATAV	ASGERAV LG	AGAASAGTGS	VALGDS----	-----ASAK
<i>Salmonella enterica</i>	957	NTDAVNVAQL	KASEAGSVRY	ETNADGSVNY	SVLNLGDGSG	GTTR-IGNVS
<i>Xylella fastidiosa</i>	810	ADNAVAIGNH	SVADRANT--	-----	--VSVGSA--	GSERQVTNVA
<i>Burkholderia fungorum</i>	677	ADNSVALGQG	SIADRANT--	-----	--VSVG--AA	GOERQITNVA
<i>B. glumae bgp3</i>		GANSVALGAG	SVADQDNA--	-----	--VSIIGNAAT	GMTRILSNVS
<i>Salmonella enterica</i>	1000	AAVNDTDAVN	YAQLKRSVE-	---EANTYTD	QKMGEMNSKI	KGIENKMSGG
<i>Xylella fastidiosa</i>	844	AGTADTDAVN	VSQLNQG---	-LITAKQYTD	GVVGSLRRDT	-----DGG
<i>Burkholderia fungorum</i>	711	AGVQGTDAVN	VNQLQOSVSG	ALSOANSYTD	DQIRSAARRDS	-----YGG
<i>B. glumae bgp3</i>		PGVAPTDAVN	VQQLNDSVTG	L-----A	NQIEHRRDA	-----NGG
<i>Salmonella enterica</i>	1046	IASAMAMAGL	PQAYAPGANM	TSIAGGT FNG	ESAVAIGVSM	VSESGGWVYK
<i>Xylella fastidiosa</i>	883	VAAAIATANL	PQAYIPGRGM	TSVGVSSYRG	QSAIAGVSS	VSESGRWVFK
<i>Burkholderia fungorum</i>	754	TASAMAMAGL	PQAVLPGHGM	VAMAGGTYAG	QSAFATGVSQ	LSETGKWVYK
<i>B. glumae bgp3</i>		TAAAVAMASL	PQAPAPGKTM	VATGGGTYAG	QSAMAVGVST	Y--AGRWVWK
<i>Salmonella enterica</i>	1096	LQGTSNSQGD	YSAAIAGGFQ	W	1116	
<i>Xylella fastidiosa</i>	933	FSGSANTRSQ	VGIGAGVGYQ	W	953	
<i>Burkholderia fungorum</i>	804	LQGTDSRGG	FGASIGAGMH	W	824	
<i>B. glumae bgp3</i>		ASGSTNSRGT	VAAFGAGYT	W		

図6. *bgp3*遺伝子のC末端アミノ酸配列における相同性

Salmonella enterica (putative autotransporter); NP_807449

Xylella fastidiosa(Autotransporter adhesin); ZP_00039883

Burkholderia fungorum (Autotransporter adhesin); ZP_00027577

網掛け部分はアミノ酸配列の一致を示す

IS1418 (相補鎖)	?CC?GCGGCG	??TGCA?ATA	CGAGCCTTGA	TGCCG?C??G	C???TG?T?C	??TCAGATA?
pNP147(3099~)	TGCCGCGAAT	GTTGACCCGA	?CCAAG??GC	CGGCTTGAC	CTGGTTCGT	CA?A?AGAC?
IS1418	ACGTGG?G?C	AACGCC?C?G	AAGTCA?A?C	C?C?T??TTG	TCAG??CG?T	GCAGTTTGCT
pNP147	TAGTGTCC?C	GCGGCTGA??	TCAAAGCCGC	GTAATTGACC	GTTCCGCTG?A	GTTCAATC??
IS1418	CGGGCGGTTG	CGTGGCGGAC	CGTTCA?GCC	CGGGTACCGC	AGGAATGGCA	TGCAGCGTGG
pNP147	?CGTTT?CAT	GATGCAGCG?	?CATGCC???	?TCCCTCAGT	??TCGTGTCC	??CGTT?ATT
IS1418	A??CTCGAAT	GCCATCGAAT	CGTGGCGGTT	GGCTCCCGTG	ATCGTGACGG	CCAGAGGAAT
pNP147	TCCCGAGAAT	GCCATCGAAT	CGTGCCGGTT	GGCTCCCGTG	ATCGTGACAG	CCAGCGGGAT
IS1418	GCCGCGTGCA	TCTACGACGA	TGTGTCGCTT	CGATCCGAGC	TTGCCGCGGT	CGGTCGGGTT
pNP147	GCCGCGTGCA	TCTACGACGA	TGTGTCGCTT	CGATCCGAGC	TTGCCGCGGT	CGGTCGGGTT
IS1418	GGGGCCGGTT	TCCTGGCCCC	CCGGGGGCTG	GAGACGCTGG	CTCCATCGAG	GCTGGCGCGC
pNP147	GGGGCCGGTT	TCCTGGCCCC	C?GGGGGCTG	GAGACGCTGG	CTCCATCGAG	G?TGGCGCGC
IS1418	TCCCAATCGA	TCTGGTCGTG	CTCACGCAGC	CGACGCAGCA	TGCCCAGATG	CAGCCGATGC
pNP147	TCCCAATCGA	TCTGGTCATG	?TCACGCAGC	CGGCGCAGCA	TGCCCAGATG	CAGCCGATGC
IS1418	CATACACCGG	CCGCTTGCCA	GTCCCGCAGA	CGTCGCCAAC	ACGTCATGCC	ACTGCCGAAG
pNP147	CACACECCGG	CCGCTTGCCA	GTCTCGCAGA	CGTCGCCAGC	ACGTCATGCC	GCTGCCAAAA
IS1418	CCCAGTCTTT	GCGGGAGGTC	TTCCCACGGG	ATGCCGTTTT	GCAGCACATA	CAGGATGCCG
pNP147	CCCAGTCTTT	GCGGAAGGTC	TTCCCACGGG	ATGCCAGTTT	GCAGCACATA	GAGGATGCCG
IS1418	TTGAGCGCAG	CTCGGTCAATC	GACCGTGCGC	CGCCGTCCGC	CCCTGGGGCA	TGGGTGAAT
pNP147	TTGAGTGCAG	CTCG?TCATC	GACCGTGCGC	CGCCGTCTGC	???T??????	TG?????AAT
IS1418	TCCGGAATCA	GAGGTTCCAG	TGCCACCCAC	AATTCAATTGC	TGATTTTGCG	TCTTGCCATA
pNP147	TCCGGAATCA	GAGGTTCCAG	CGCCACCCAC	AACTCGTTGC	TGATTTTGCG	TCTTGCCATG
IS1418	TC?GCAGACG	ATACGATTTC	TGCTACGTCA	TGTCTAGGTT	ATGTTAGCGG	CTC
pNP147	?CAGCGGACG	ATACGACTTC	TGCTGCCTCA	TGTCTAGGTT	GTGTTAGCGG	TTCTAAATCC

図7. IS1417上流に見出されたIS1418様DNA配列 (3099~3766)

網掛け部位はDNA配列の一致を示す
 矢印はIS1418の向き (相補鎖) を示す

かし、ORFの存在が認められないことから、転移因子としては機能しないものと考えられた。

以上の結果から、図8に示すように、病原性欠損変異株 No. 19 を相補するゲノム DNA 断片中には、IS1417 が存在し、その下流には逆方向に *bgp1*, 2, 3 の ORF、および上流には IS1418 様配列が存在することが明らかになった。

2. ゲノム上における Tn4431 挿入箇所と IS との関係

イネもみ枯細菌病菌の病原性欠損変異株 No. 19 におけるゲノム上の Tn4431 挿入領域を解明するために、変異株 No. 19 の Tn4431 を含む DNA 領域を挿入したコスミド pNP19-1 を用いて、Tn4431 を含む下流側の塩基配列を決定した。その結果、図9に示すように Tn4431 挿入部位の下流側には、IS1417 の塩基配列は認められなかったものの、3' 末端側に *bgp1* 遺伝子および IS1417-*bgp1* 遺伝子スペーサー配列の存在が確認された。そこで、野生株のゲノム塩基配列と Tn4431 挿入部位の塩基配列を詳細に比較したところ、図10に示すように、野生株では IS1417 配列の外側それぞれに CCG 配列が存在していたのに対し、変異株 No. 19 の場合は IS1417 の欠落部位と思われる箇所に一つだけの CCG 配列が認められた。このことから、IS1417 のターゲット配列が CCG であり、変異株 No. 19 においては、IS1417 配列が欠落していることが明らかとなった。また、変異株 No. 19 ではターゲット配列より 78 bp 上流にトランスポゾン Tn4431 内に存在する *lux* 遺伝子の配列が見られることから、この部位に Tn4431 が挿入

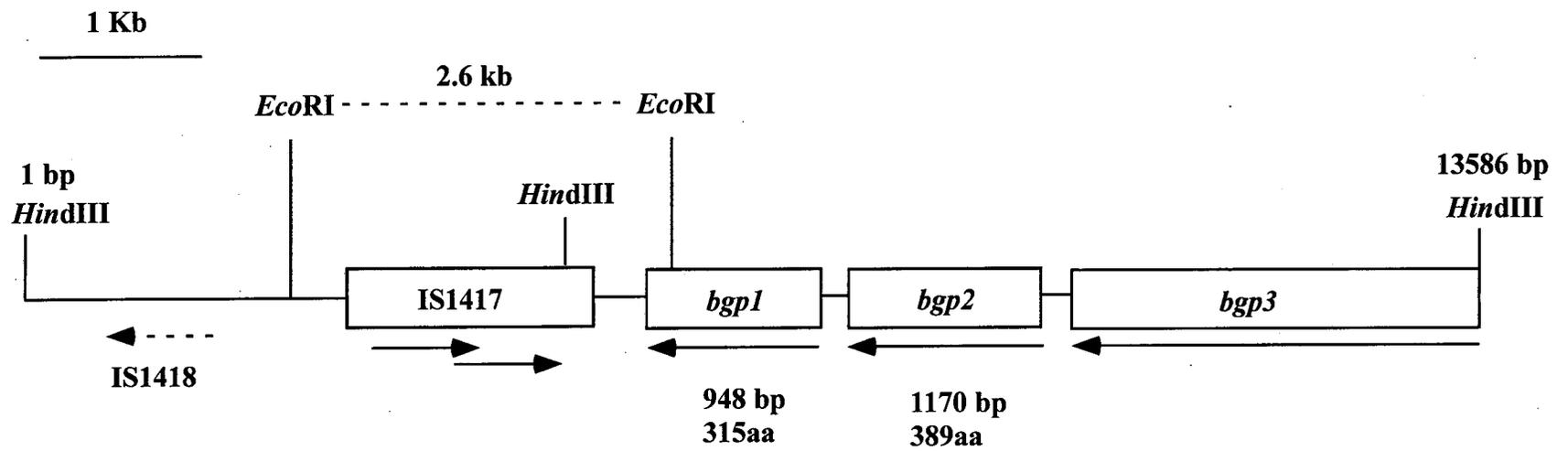


図8. コスミドpNP147にてクローニングされたゲノムDNA上の遺伝子配置図

矢印はORFの向き、点線矢印はIS1418と相同性のあった断片

IS1417: 5448-6784 bp, *bgp1*: 8261-7314 bp, *bgp2*: 9799-8630 bp, *bgp3*: 13586-11081 bp

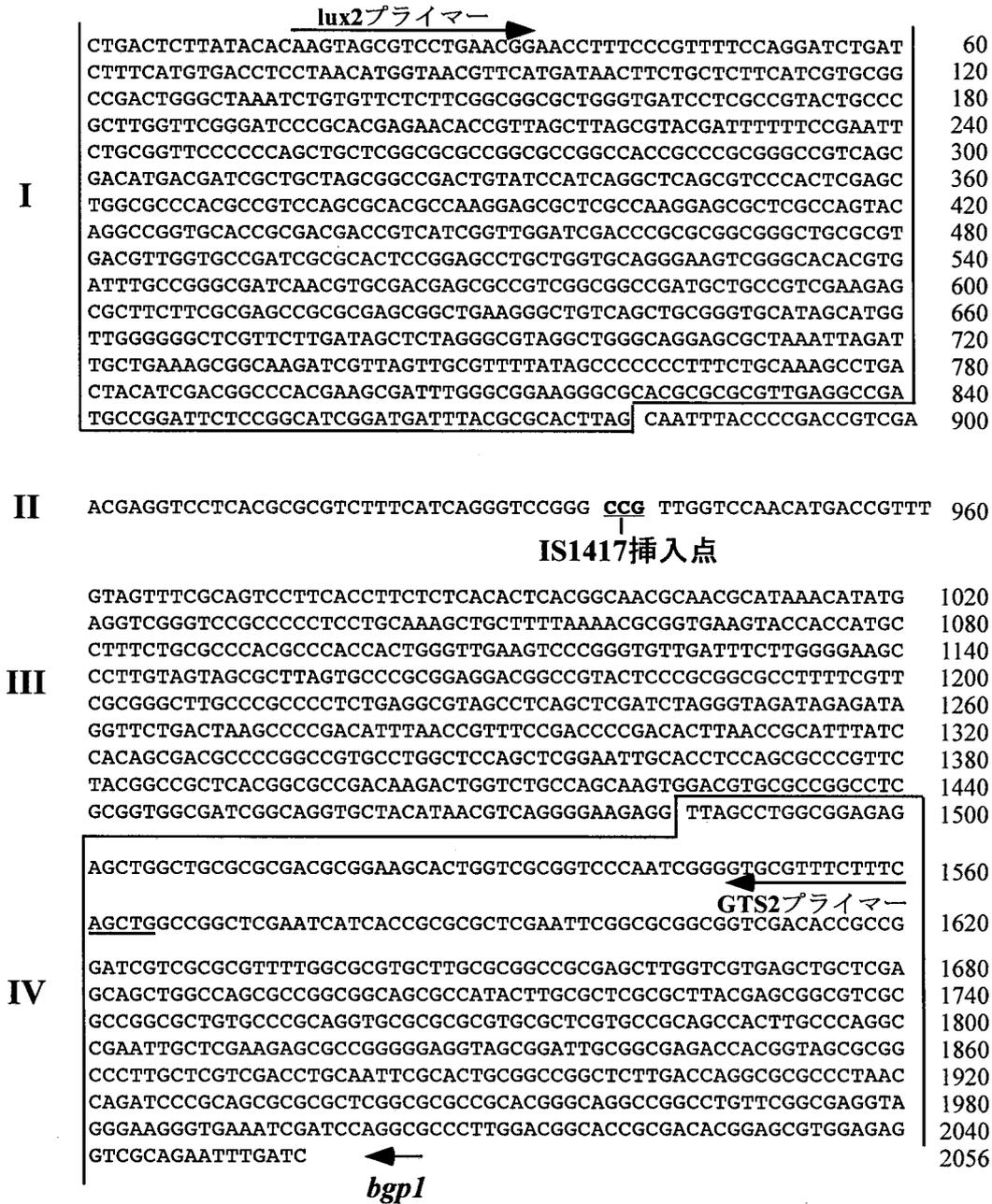


図9. 変異株No. 19におけるTn4431挿入部位下流の塩基配列

I: Tn4431

II: IS1417上流部位

III: IS1417-*bgp1*遺伝子間のスペーサー

IV: *bgp1*遺伝子

短い矢印は*bgp1*遺伝子の方向、長い矢印はプライマー

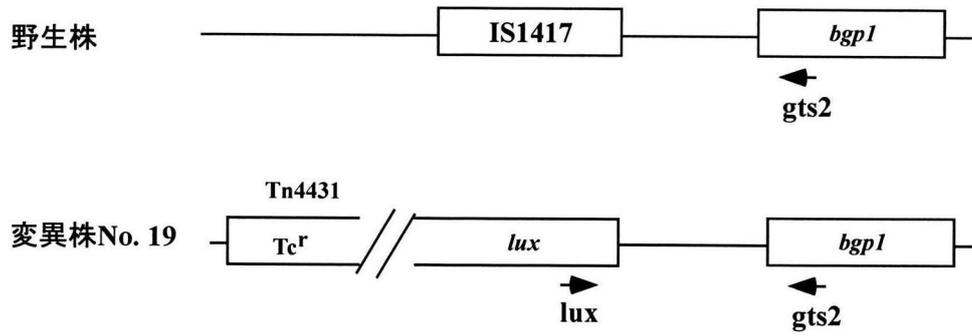
太字下線部はIS1417の挿入点

されるものと考えられた。

なお、Tn4431 の挿入部位を再確認するために、図 11A に示すように、変異株 No. 19 ゲノム DNA における Tn4431 内の Lux オペロン上に設計した lux プライマーと、*bgp1* に設計した *gts2* プライマーを用いて、野生株と変異株 No. 19 のゲノム DNA について PCR 反応を行った。その結果、変異株 No. 19 のゲノム DNA では理論上の約 1.5 kb の位置にバンドが検出されたが、野生株では全く増幅が認められなかった（図 11B）。つまり、変異株 No. 19 のゲノム DNA では、*bgp1* の近傍に Tn4431 の Lux 遺伝子が挿入されているため増幅が起こったものと考えられた。さらに、変異株 No. 19 の Tn4431 近傍には、本来存在するはずの IS1417 が欠落していたことから、野生株および変異株 No. 19 のゲノム DNA 中に散在する IS1417 の有無について比較を行った。図 12 に示した IS1417 内の *HincII* 断片約 1 kb をプローブとし、両株のゲノム DNA を *bgp1* 遺伝子上および IS1417 上流に存在する *EcoRI* サイトで切断し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、図 13 に示すように、両株とも IS1417 が 8 から 9 コピー存在していることが明らかとなったが、野生株で見出された 2.6 kb の断片は、変異株 No. 19 では検出されなかった。

これらのことから、変異株 No. 19 ゲノム DNA においては、Tn4431 の挿入により、近傍に存在した IS1417 が排出されたことが考えられた。

A



B

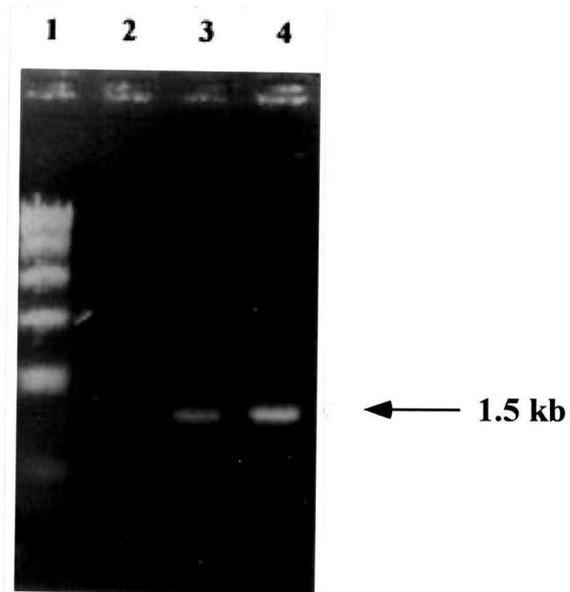


図11. ゲノム上におけるTn4431の挿入カ所のPCR確認

A. 矢印はプライマーの位置

Tc^r : Tc耐性遺伝子

B. プライマー-luxおよび*gts2*によるPCR増幅

レーン1 : マーカー

レーン2 : 野生株

レーン3 : 変異株No. 19

レーン4 : pNP19-1

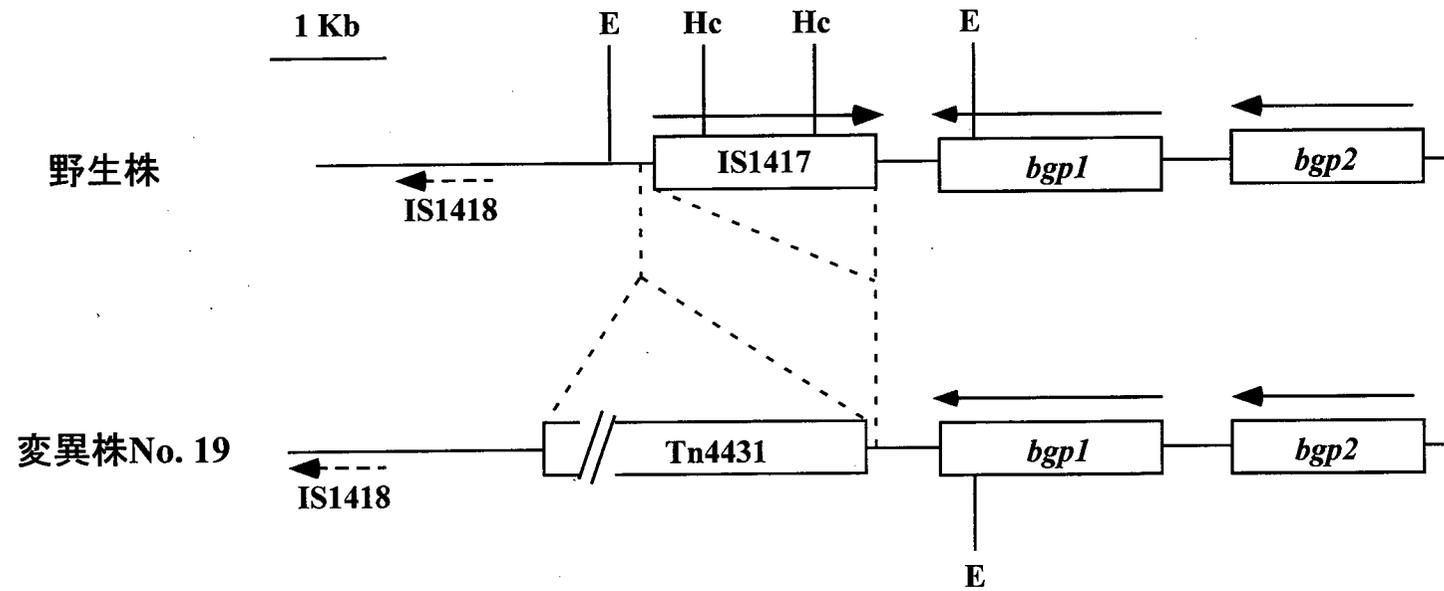


図12. 野生株および変異株No. 19におけるIS1417とTn4431の挿入点
 矢印はORFの方向を示す
 E: *EcoRI*、Hc: *HincII*

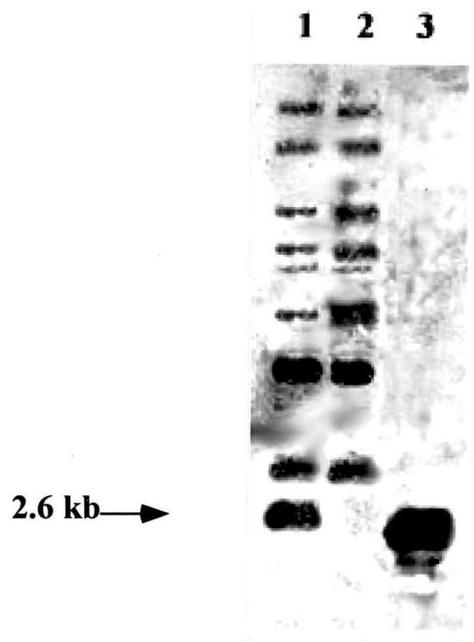


図13. ゲノム中におけるIS1417のコピー数

レーン1: 野生株

レーン2: 変異株No. 19

レーン3: pUC401

DNAは*Eco*RIで切断、プローブはIS1417断片

3. IS1417 による遺伝子発現制御

IS1417 が下流遺伝子の発現に関与するか否かを調べるため、野生株および変異株 No. 19 の全 RNA について、*bgp1* の遺伝子発現を基準に RT-PCR による比較を行った。その結果、野生株では *bgp1* の RNA からの増幅が認められたのに対し、変異株 No. 19 では全く増幅が認められなかった (図 14A)。このことから、変異株 No. 19 においては *bgp1* が発現しないことが明らかとなった。また、その発現には近隣の IS1417 の存在が重要であることが考えられた。しかし、IS1417 は自身のコードするトランスポザゼによって転移する DNA 配列であり、変異株 No. 19 においても IS1417 トランスポザゼは発現していることから (図 14B)、変異株 No. 19 の培養過程で IS1417 が *bgp1* 遺伝子下流に復帰挿入される可能性が考えられる。そこで、変異株 No. 19 を独立的に 3 回培養を行い、それぞれの菌体からゲノム DNA を抽出し、図 15A に示すように、*gts1-gts2* プライマーを用いた PCR 法によって、*bgp1* 遺伝子から IS1417 までの増幅を試みた。その結果、3 培養株ともに目的長の DNA を増幅することができなかったことから、変異株 No. 19 における、*bgp1* 遺伝子下流の IS1417 欠失は必然的であることが示唆された (図 15B)。

これらのことから、*bgp1* 遺伝子発現には、IS1417 の存在が必須であると考えられた。

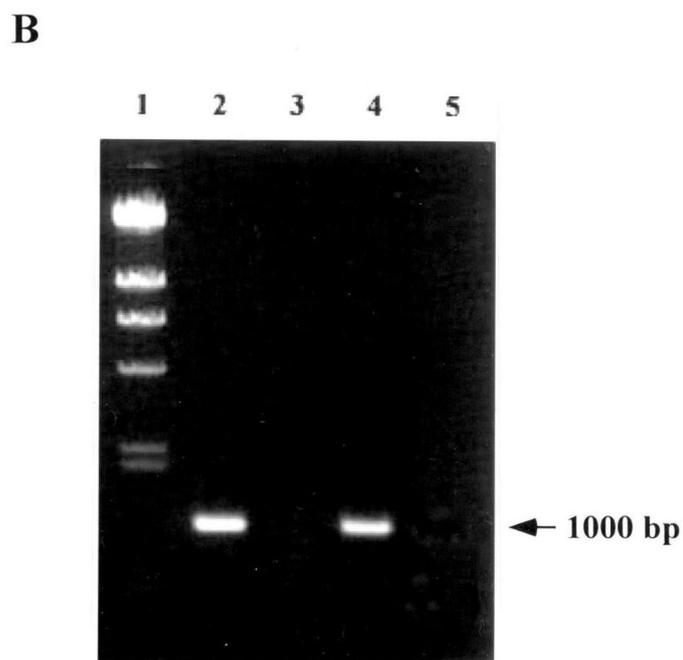
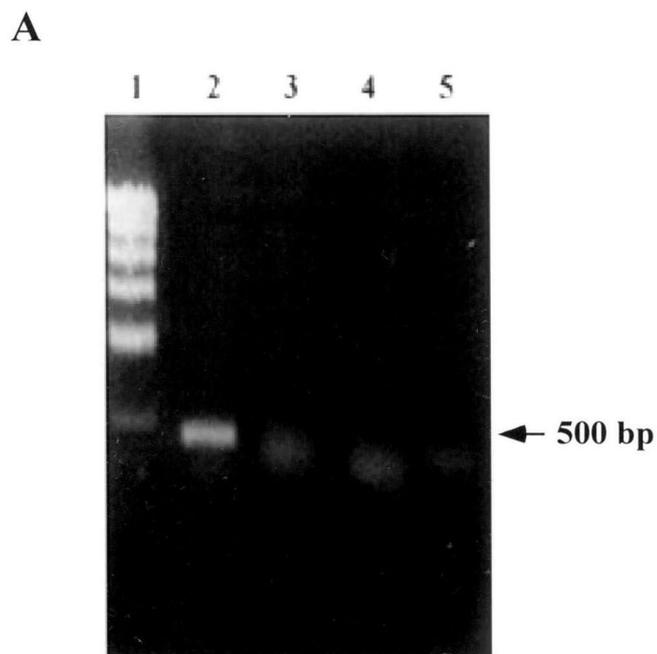


図14. RT-PCRによる*bglI*遺伝子およびIS1417のmRNA増幅

A: プライマーgts6およびgts9による*bglI*遺伝子のRT-PCR

B: プライマーgts4およびgts5によるIS1417のRT-PCR

レーン1: マーカー

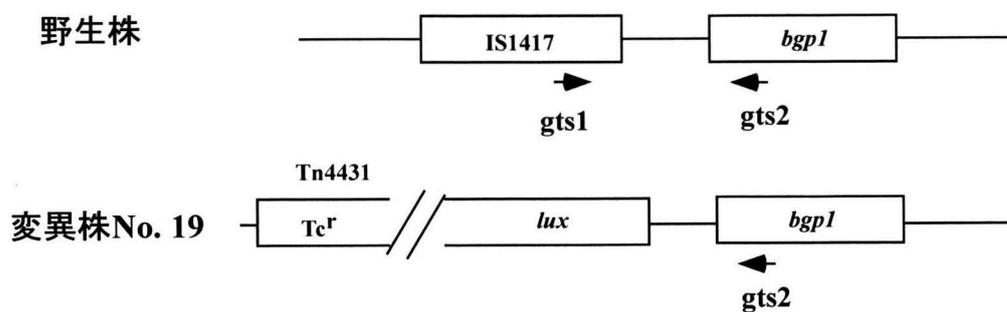
レーン2: 野生株

レーン3: 野生株 (逆転写酵素なし)

レーン4: 変異株No. 19

レーン5: 変異株No. 19 (逆転写酵素なし)

A



B

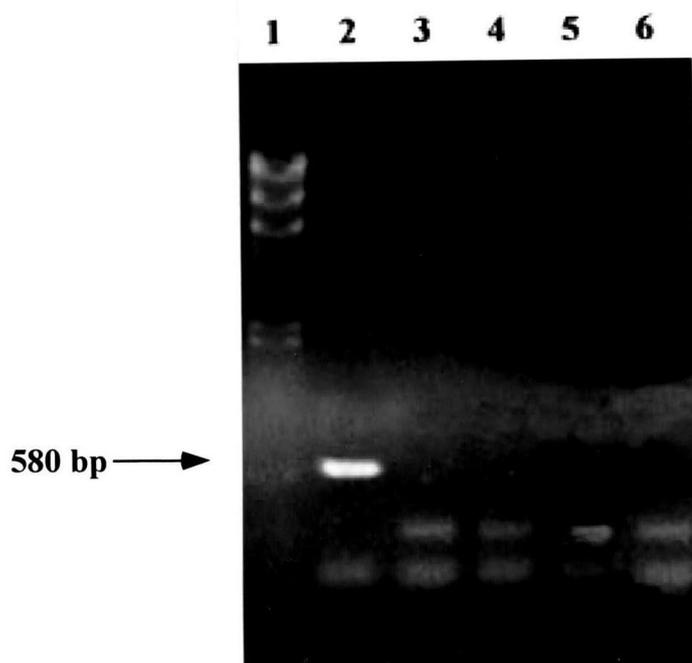


図15. 変異株No. 19ゲノムDNAにおけるIS1417-*bgp1*断片のPCR増幅

A. 矢印はプライマーの位置

B. プライマー-*gts1*および*gts2*によるPCR増幅

レーン1: マーカー

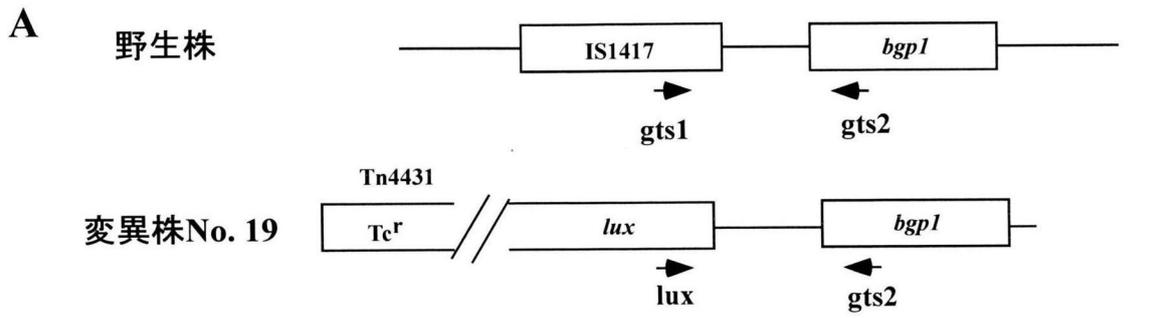
レーン2: 野生株

レーン3~6: 変異株No. 19

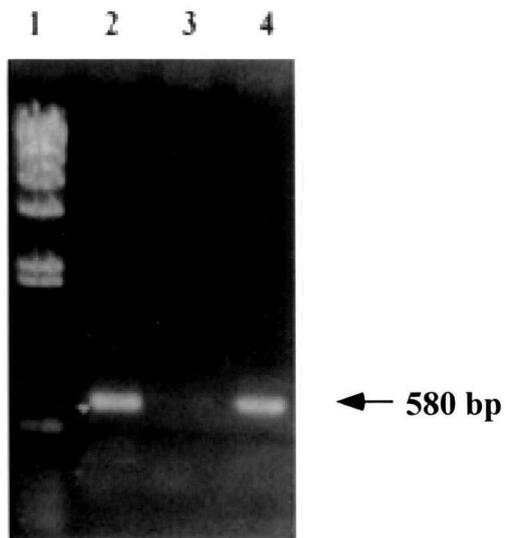
4. IS 転移による毒素産生能の復帰

IS1417 の存在が毒素産生に関連しているか否かを確認するために、変異株 No. 19 から毒素産生復帰株を得ることを試みた。変異株 No. 19 は Tn4431 由来の Tc 耐性であるために、Tc を含まない King's B 液体培地にて継代して 20 時間培養を 2 回経過した後、King's B 固形培地上へ塗布し、現れた 50 個のコロニーを選抜した。それぞれについて Tc 耐性を調べたところ、45 個のコロニーが Tc 感受性を示した。この中より 4 コロニーを CaPG 培地で培養して毒素産生能を確認したところ、1 個のコロニーが毒素産出能を復帰していることが認められた。この株を復帰株 No. 19R と命名した。この復帰株 No. 19R のゲノム DNA について、図 16A のように *gts1-gts2* プライマーを用いて、PCR 増幅で IS1417 の挿入を確認したところ、復帰株 No. 19R ゲノム DNA からは目的長の DNA が増幅され、*bgp1* 下流に IS1417 配列が復帰していることが認められた (図 16B)。さらに *lux-gts2* プライマーにて復帰株 No. 19R における Tn4431 の PCR 検出を行ったところ、バンドが確認されなかった。つまり、復帰株 No. 19R ではゲノム上から Tn4431 が消失していることが明らかとなった。

以上の結果、変異株 No. 19 では IS1417 と Tn4431 が拮抗的に *bgp1* 下流へ挿入されること、また IS1417 が *bgp1* 下流へ復帰挿入される場合には、*bgp1* 遺伝子の発現も復帰することが確認されたことから、*bgp1* 遺伝子発現には IS1417 挿入が密接に連動しているものと考えられる。



B



C

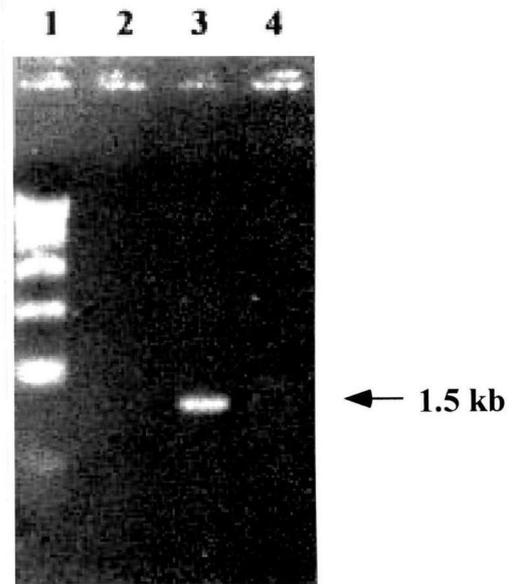


図16. 復帰株No. 19RゲノムDNAにおけるIS1417-*bgp1*断片の検出

A: 野生株および変異株No. 19におけるプライマーの位置

B: *gts1*および*gts2*プライマーを用いたPCR増幅

C: *lux*および*gts2*プライマーを用いたPCR増幅

レーン1: マーカー

レーン2: 野生株

レーン3: 変異株No. 19

レーン4: 復帰株No. 19R

5. *bgp1* および IS1417 の遺伝子破壊と毒素産生との関係

イネもみ枯細菌病菌の変異株 No. 19 において、*bgp1* 遺伝子の発現が認められなかったことから、*bgp1* 遺伝子が毒素産出と関係している可能性が考えられた。そこで、相同組換えによる *bgp1* 遺伝子破壊株の作製を試みた。*bgp1* 遺伝子はその ORF 内に制限酵素サイト *EcoRI* と *PstI* を有しているため、制限酵素 *EcoRI-PstI* 断片を切り出し、pUC18 に挿入した後、このベクターの *HindIII* 部位に *km* 耐性遺伝子を組み込み、*bgp1* 遺伝子破壊ベクター pMY403 を作製した(図 17)。このベクターを用いて 1 回相同組換え法により、イネもみ枯細菌病菌の野生株の *bgp1* 遺伝子破壊株を作出した。得られた破壊株の中から 1 コロニーを選び、MY403 株と命名した。この株のゲノム DNA を *EcoRI* で切断し、*bgp1* 遺伝子内の *EcoRI-PstI* 断片をプローブとし、サザンハイブリダイゼーションを行った結果、野生株では 2.5 kb の断片がのみが検出されたのに対し、破壊株では目的長の約 2.5 Kb と 4.7 kb の断片が検出されたことから、*bgp1* 遺伝子が破壊されていることが確認された(図 18)。そこで、この *bgp1* 遺伝子破壊株 MY403 の毒素産生能について CaPG 培地上で調べた結果、野生株ではトキシフラビン特有の黄色物質を産生したのに対し、破壊株では黄色物質の産生が認められなかった(図 19)。このことから、*bgp1* 遺伝子を破壊した MY403 株では毒素産生能が欠損していることが確認された。

同様に、IS1417 の破壊を試みた。IS1417 配列はゲノム中に多コピー存在するため、2 回相同組換え法により遺伝子破壊を行った。IS1417 トランスポザーゼ遺伝子中に、*Km* 耐性遺伝子を挿入した遺伝子破壊ベクター pMY402 を作製し(図 20)、イネもみ枯細菌病菌の野生株に導入した後、*Km* を含んだ LB 培地

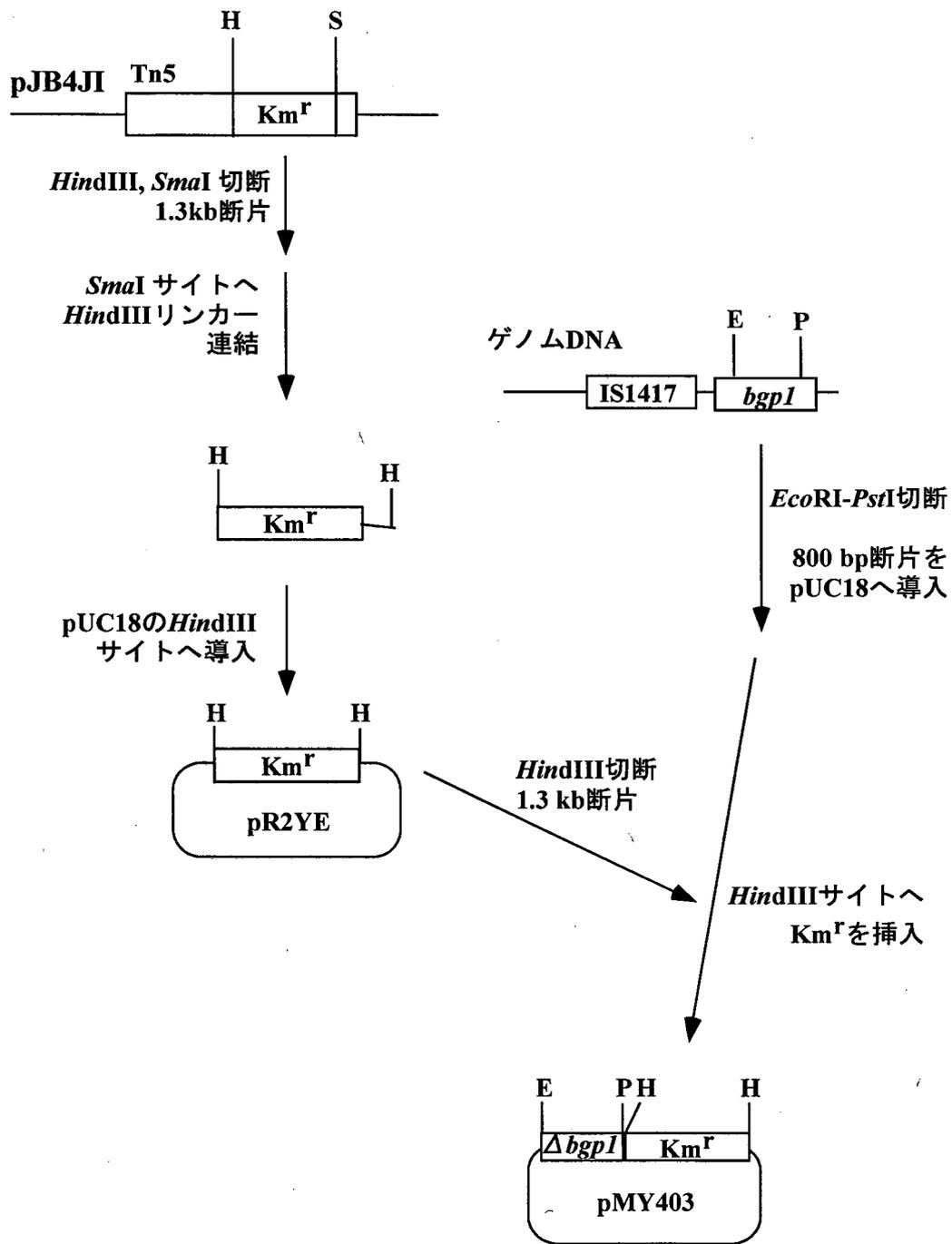
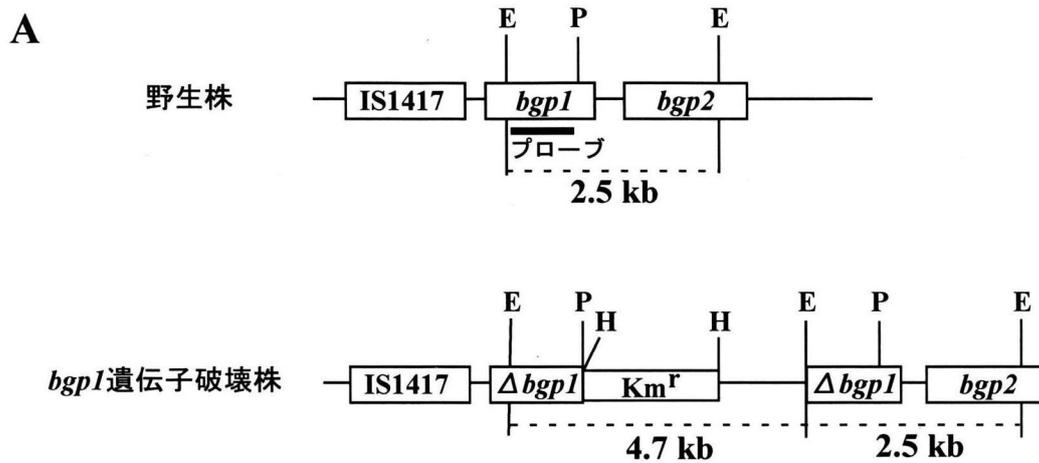


図17. *bgp1*遺伝子破壊ベクターpMY403の構築

E: *EcoRI*, P: *PstI*, H: *HindIII*, S: *SmaI*, Km^r : Km 耐性遺伝子



B

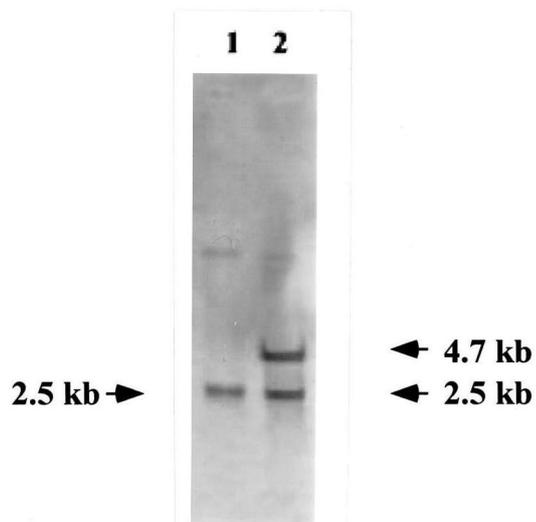


図18. *bgp1*遺伝子の破壊株の確認

A: 野生株および*bgp1*遺伝子破壊株のゲノム模式図

E: *EcoRI*, P: *PstI*, H: *HindIII*, *Km^r*: *Km*耐性遺伝子

太いバーはプローブ部位

B: サザンハイブリダイゼーションによる*bgp1*遺伝子破壊の確認

レーン1: 野生株ゲノム

レーン2: *bgp1*遺伝子破壊株ゲノム



図19. *bgp1*遺伝子破壊株MY403における毒素産生能の欠損
左：野生株、右：*bgp1*遺伝子破壊株MY403

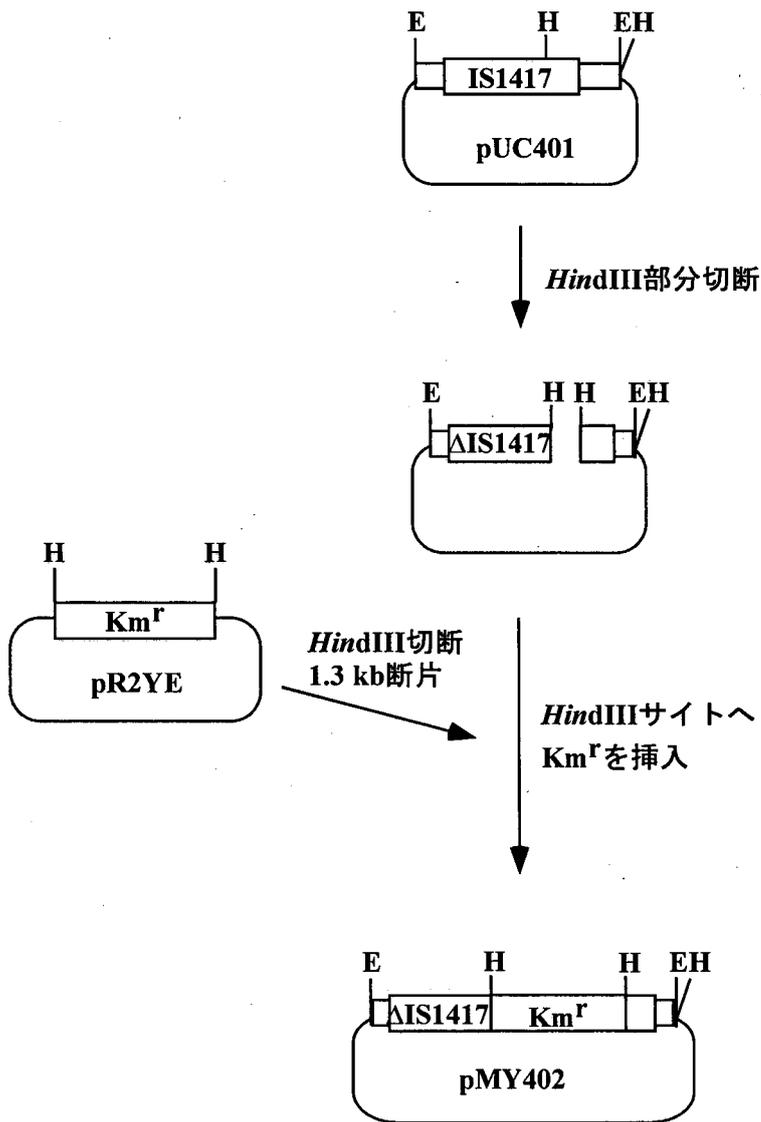


図20. IS1417遺伝子破壊ベクターpMY402の構築

E: *EcoRI*, H: *HindIII*, Km^r: Km耐性遺伝子

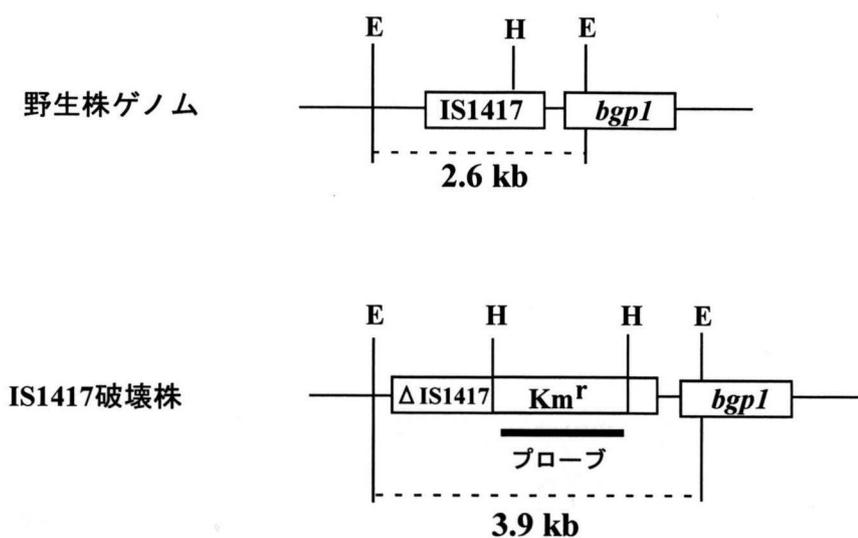
にて選抜し、数個のコロニーを得た。その中のひとつ MY402 株を用いて、ゲノム DNA を *EcoRI* で切断し、Km 耐性遺伝子をプローブとし、サザンハイブリダイゼーションを行った結果、IS1417 破壊株 MY402 においては、Km 耐性遺伝子 1.3 Kb を含む、約 4 Kb の断片が検出された。このことから、Km 耐性遺伝子が目的の IS1417 に挿入されていることが分かった (図 21)。そこで、この破壊株について毒素産生能を CaPG 培地上で調べた結果、毒素産生能力を有することが明らかになった (図 22)。

以上の結果から、IS1417 は下流遺伝子である *bgp1* 遺伝子の発現には必要であるが、IS1417 内に存在するトランスポザナーゼ遺伝子それ自体は遺伝子発現と直接関連しないものと考えられた。

6. 変異株 No. 19 および *bgp1* 遺伝子破壊株 MY403 のトキシフラビン感受性

イネもみ枯細菌病菌変異株 No.19 をトキシフラビン含有培地で培養した場合、非常に成長が遅いことが認められた。そこで、変異株 No. 19 のトキシフラビン感受性について調べた。トキシフラビン 1 $\mu\text{g/ml}$ 、あるいは 10 $\mu\text{g/ml}$ を含む King's B 液体培地に野生株、病原性欠損変異株 No. 19、IS1417 遺伝子破壊株 MY402 株、*bgp1* 遺伝子破壊株 MY403 を培養し、その生育曲線を比較したところ、MY402 株では、野生株と同様な生育が見られたが、変異株 No. 19 および MY403 株では 1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度で、生育が著しく抑えられた (図 23)。また、トキシフ

A



B

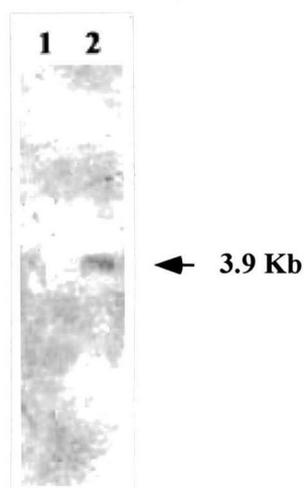


図21. IS1417遺伝子の破壊株の確認

A: 野生株およびIS1417遺伝子破壊株のゲノム模式図

E: *EcoRI*, H: *HindIII*, Km^r: Km耐性遺伝子

太いバーはプローブ部位

B: サザンハイブリダイゼーションによるIS1417遺伝子破壊の確認

レーン1: 野生株ゲノム

レーン2: IS1417破壊株ゲノム

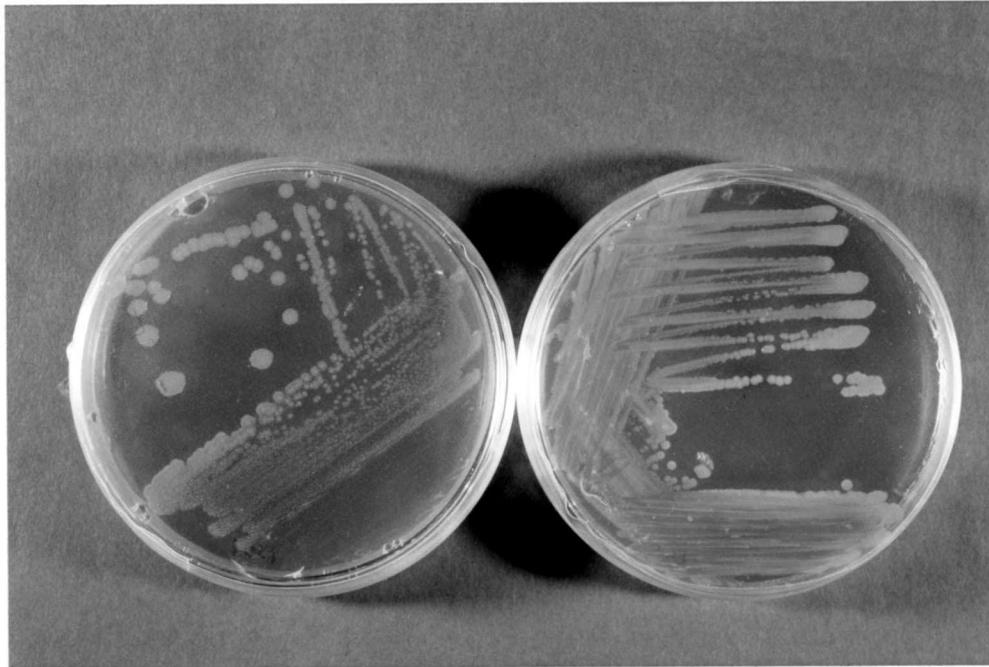


図22. IS1417破壊株MY402におけるの毒素産生能
左：野生株、右：IS1417破壊株MY402

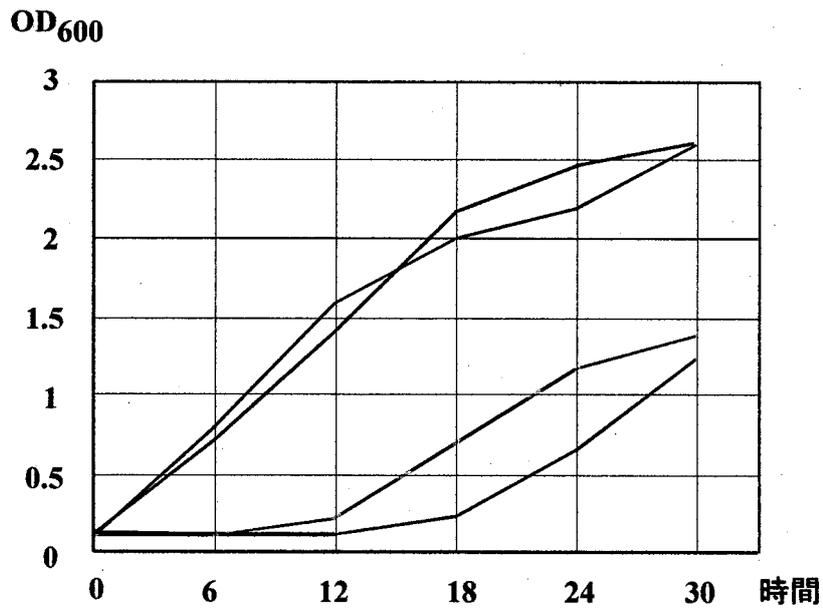


図23. 各種変異株のトキシフラビン1 µg/ml添加培地における増殖

- 黒ライン：野生株
- 緑ライン：IS1417破壊株MY402
- 黄ライン：病原性欠損変異株No. 19
- 赤ライン：*bgp1*遺伝子破壊株MY403

ラビン 5 $\mu\text{g/ml}$ 含む King's B 固形培地上でそれぞれの菌株を画線培養したところ、変異株 No. 19 および MY403 株では全く発育が認められなかったことから、両菌株はトキシフラビン感受性になっていることが明らかとなった (図 24)。つまり、*bgp1* 遺伝子がトキシフラビンの耐性に関与している可能性が示唆された。

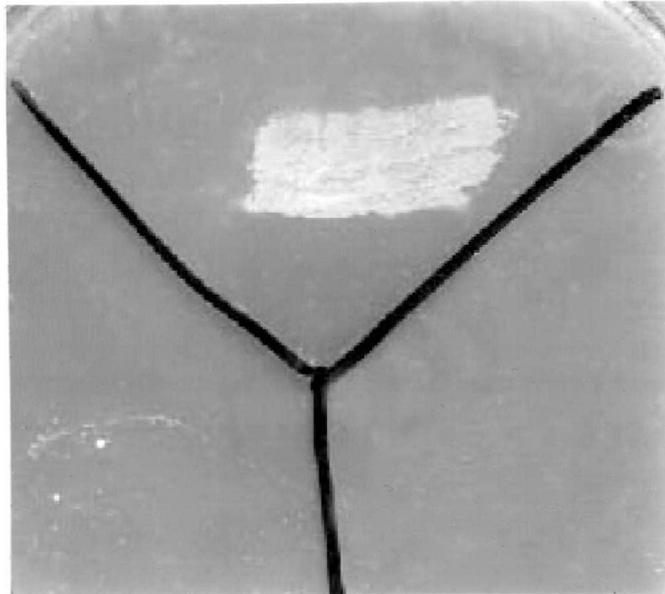


図24. 各種変異株のトキシフラビン感受性

トキシフラビン5 µg/ml添加 King's B培地における生育

上：野生株

左下：病原性欠損変異株No. 19

右下：*bgp1*遺伝子破壊株MY403

考察

本章では、イネもみ枯細菌病菌の毒素産生欠損変異株 No. 19 と、その毒素産生能を回復する野生株ゲノムライブラリーのコスミド pNP147 について解析を行った。コスミド pNP147 には、変異株 No. 19 の Tn4431 挿入部位を相補する遺伝子がクローニングされていると考えられたため、そのクローニングされたゲノム DNA 断片および変異株 No. 19 の Tn4431 挿入部位のゲノム DNA について比較を行い、本菌の産生する毒素トキシフラビンの耐性に関与する *bgp1* 遺伝子、およびその転写を制御している IS1417 配列の存在を明らかにした。

IS1417 は 2 つの ORF で構成されており、他の多くの IS ファミリーに見られるように、その内部の AAAAAAA 部位にてフレームシフトが起こることにより、結果として 1 つの ORF としてトランスポザナーゼ酵素を産出すると考えられた (Hu et al., 1994; Hu et al., 1996; Farabaugh, 1996)。また、WxxD、N3 および C1 モチーフが確認され (Mahillon et al., 1985; Ronecker et al., 1987; Rezsóhazy et al., 1993)、転移因子として働くことが示唆された。変異株 No. 19 においては、本来 IS1417 が挿入されるべき領域に、トランスポゾン Tn4431 が挿入されたため、IS1417 が排出されていることが明らかとなった。これは、変異株 No. 19 への Tn4431 の挿入イベントが起きた時に、その挿入ポイントの近傍にある IS1417 が立体構造上において何らかの問題となり、この部位より除外されたものではないかと考えられる。また、この部位から Tn4431 が除去された場合にのみ、IS1417 の復帰が見られたことから、Tn4431 と IS1417

は拮抗的にこの部位に挿入されるものと考えられる。さらに、IS1417 はターゲット部位である CCG 配列に可逆的に出入りが可能であり、特に IS1417 の周辺には、*P.syringae* pv. *phaseolicola* の IS100 (Jackson et al., 1999) の部分配列と相同性の高い配列が存在していることから、この領域は IS のホットスポットとなる部位で、DNA の構造上不安定な領域ではないかと推測される。

本菌は数回の継代にて病原性を失うことが知られており (Kamiunten et al., 1985)、トキソフラビン産生能についても、非常に不安定である。これまでこの不安定な要素は解明されていないが、今回見出された IS1417 は可動性であり、その不安定さの要因となっていることが考えられる。なお、IS1417 の上流には、約 500 bp にわたり、イネもみ枯細菌病菌から単離された IS1418 (accessin number: AB010572) と相同性の高い DNA 領域が存在したが、その 3' 末端の繰返し配列が欠損しているため、遺伝子の機能は欠失していると考えられる。

数種の植物病原細菌において病原性関連遺伝子の周辺に IS 遺伝子が存在することが知られている。例えば、ダイズ斑点細菌病菌の産出する毒素コロナチンの生合成遺伝子クラスターには、毒素合成調節領域と生合成遺伝子の間にトランスポゼースをコードする遺伝子が存在し (Rangaswamy et al., 1998)、ビワがん病菌 (*P. syringae* pv. *eriobotryae*) の病原性遺伝子上流には大腸菌の IS3 と相同性の高い ORF が存在する (Kamiunten, 1999)。これら IS 遺伝子は細菌間における病原性因子の水平移動に関与していると考えられている。

病原性欠損変異株 No. 19 は、*bgp1* 遺伝子の下流に本来存在するはずの

IS1417 が欠落しているが、一方、変異株 No. 19 の毒素産生復帰株 No. 19R においては IS1417 の存在が認められたことから、IS1417 の存在は、毒素産生に関係があると示唆された。しかし、IS1417 を破壊した MY402 株では、毒素産生能を欠損しなかったことから、IS1417 のトランスポゼース遺伝子それ自体は、直接 *bgp1* 遺伝子発現には関与しないものと考えられる。

これまでに知られている IS 遺伝子の機能は、自らの持つ転移因子によって他の遺伝子に挿入し、その遺伝子の不活化を行うことが知られている。例えば、オリーブこぶ病菌 (*P. syringae* subsp. *savastanoi*) ではクラウンゴールの形成に関与するインドール酢酸 (IAA) の生合成遺伝子の 1 つである *iaaM* 遺伝子に対し自ら IS51 と IS52 の 2 つの IS を挿入させて不活化することにより、病原性の制御を行っている (Comai and Kosuge, 1983; Yamada et al., 1986)。また、トウガラシやトマトの斑点細菌病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) の IS476 は、病原性遺伝子である *avrBs1* に IS476 が挿入されると病原性を欠失することが報告されている (Kearney et al., 1990)。逆に、IS 挿入によって間接的に近隣の遺伝子を活性化することも知られている (Mahillon and Chandler, 1998)。例えば、*Burkholderia cepacia* のイソロイシンの生合成に関与する遺伝子である *ilvA* は大腸菌由来の IS2 が隣接することで転写活性が約 50 倍に高まることが知られている (Barsomian et al., 1987)。*Pseudomonas putida* でも、フェノール分解遺伝子が IS1411 のプロモーターによって転写が増大されることが知られている (Kallastu et al., 1998)。Hasebe ら (1998) は、リプレッサーを有する抗生物質耐性遺伝子発現系ベクターをイネもみ枯細菌病菌に導入し、ゲノム中のトランスポゾンがベクターのリプ

プレッサーに挿入される耐性株を選抜することにより、イネもみ枯細菌病菌からトランスポゾン単離した。同時に、この方法でリプレッサーに挿入されずに、抗生物質耐性遺伝子のすぐ上流に挿入された変異体から IS1417 を単離した。後者の変異体は、挿入されたトランスポゾン自体の転写活性により、下流の抗生物質耐性遺伝子の発現が助長されたものと推測される。Szeverenyi ら (1996) は、プロモーターレスの抗生物質耐性遺伝子を含むベクターを用いて、大腸菌ゲノム中のトランスポゾンの単離を行った結果、複数のプロモーター活性を有するトランスポゾンを単離した。このように IS には挿入した遺伝子を不活化する場合と活性化する場合があることが報告されている。

本菌の場合、図 14 で示したように、野生株と変異株 No. 19 の間で、IS1417 下流の *bgp1* 遺伝子発現において差が見られたことから、IS1417 が *bgp1* 遺伝子の発現に何らかの関与をしていると考えられる。IS1417 下流の *bgp1* 遺伝子は IS1417 と転写方向が逆であるため、IS1417 が直接プロモーター的役割を果たしているとは考えられないが、IS1417 の 3' 末端配列がターミネーターとしての役割を果たして、*bgp1* 遺伝子の発現に関与している可能性が考えられる。このような報告例として、大腸菌のグルタミンアミドトランスフェラーゼをコードする *glmS* 遺伝子の 3' 末端には、トランスポゾン Tn7 が存在し (Walker et al., 1984; Gay et al., 1986)、この Tn7 上に *glmS* 遺伝子のターミネーターが存在することが知られている (Mckown et al., 1988; Gringauz et al., 1988)。IS1417 上には、図 4-2 の塩基番号 6570 から 6590 までに、AAAGCTTCGTGAAGACCATGAAGC (下線部が逆方向反復配列) というターミネーター特有のステムループ構造をとる配列が存在したが、ステム構造

の GC 含量が少ないことから、この領域がターミネーターとして働いているか否かは未知である。

IS1417 を破壊した MY402 株の場合、毒素産生能において欠損が認められなかった。これは、IS1417 の破壊において、5'および 3'両末端の逆方向反復配列が保持されていることから、*bgp1* 遺伝子の発現が起こってしまったとも考えられる。つまり、IS1417 の両末端が、*bgp1* 遺伝子発現に何らかの役割を果たしている可能性を示唆する。

bgp1 遺伝子は *RepA* 遺伝子 (Taghvi et al., 1996; Kwong et al., 2000) と部分的な相同性は見られたものの、他の複製タンパク質遺伝子とは全く相同性がなかった。また複製タンパク質として必要とされるヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフも存在しないことから、*bgp1* 遺伝子が複製に関与しているか否かは未知である。しかし、この遺伝子を破壊した MY403 株は、変異株 No. 19 と同様に、毒素生合成能の欠損および毒素感受性を示すことから、*bgp1* 遺伝子の機能は毒素に対する耐性機構に関与する遺伝子であると推測される。つまり、変異株 No. 19 および MY403 株は毒素感受性であるため、何らかの制御によって毒素生合成が開始されないものと考えられる。なお、本菌野生株のタンパク質抽出液について、トキソフラビン分解能を調べたが、トキソフラビンの分解および修飾が起こらなかったことから、*bgp1* 遺伝子は毒素分解酵素ではないと考えられる。*bgp1* 遺伝子下流の *bgp3* 遺伝子は部分的な ORF ではあるが、その推定アミノ酸配列の C 末端領域には、様々な膜結合領域と相同性が見られた。その相同性のあるタンパク質はいずれも 100 以上のアミノ酸配列であることから、ある種の構造遺伝子であると考えられる。*bgp3* 遺伝

子については、その全長を得ることは出来なかったが、2.5 kb 以上の巨大な ORF であると推察される。これらのことから、Bgp3 の推定タンパク質は膜結合タンパク質であり、Bgp1 タンパク質と共に、毒素の排出に関わっている可能性が考えられる。また、*bgp1* と *bgp3* 遺伝子に挟まれている *bgp2* 遺伝子は、主に根粒菌の機能未知タンパク質と相同性があるものの、その機能を推測することはできなかった。

毒素産生能回復株 No. 19-61 に含まれるコスミド pNP147 は *bgp1* 遺伝子を含んでいるため、変異株 No. 19 の毒素産生能を回復させたと考えられる。この時、No. 19-61 株のゲノム上には、*bgp1* 遺伝子の上流に IS1417 は存在せず、またトランスポゾン Tn4431 は維持されていることから、毒素産生能の回復は、pNP147 上の *bgp1* 遺伝子がトランスに働いて相補をしていると考えるのが妥当である。

植物病原細菌の病原性に関わる遺伝子は多数存在し、本研究で得られた遺伝子はその一部であるが、IS1417 という可動因子が病原性に関わっている例は非常に少なく、また IS1417 が本菌の病原性の不安定さにも関連していることから、細菌の病原性発現機構として興味深いメカニズムである。

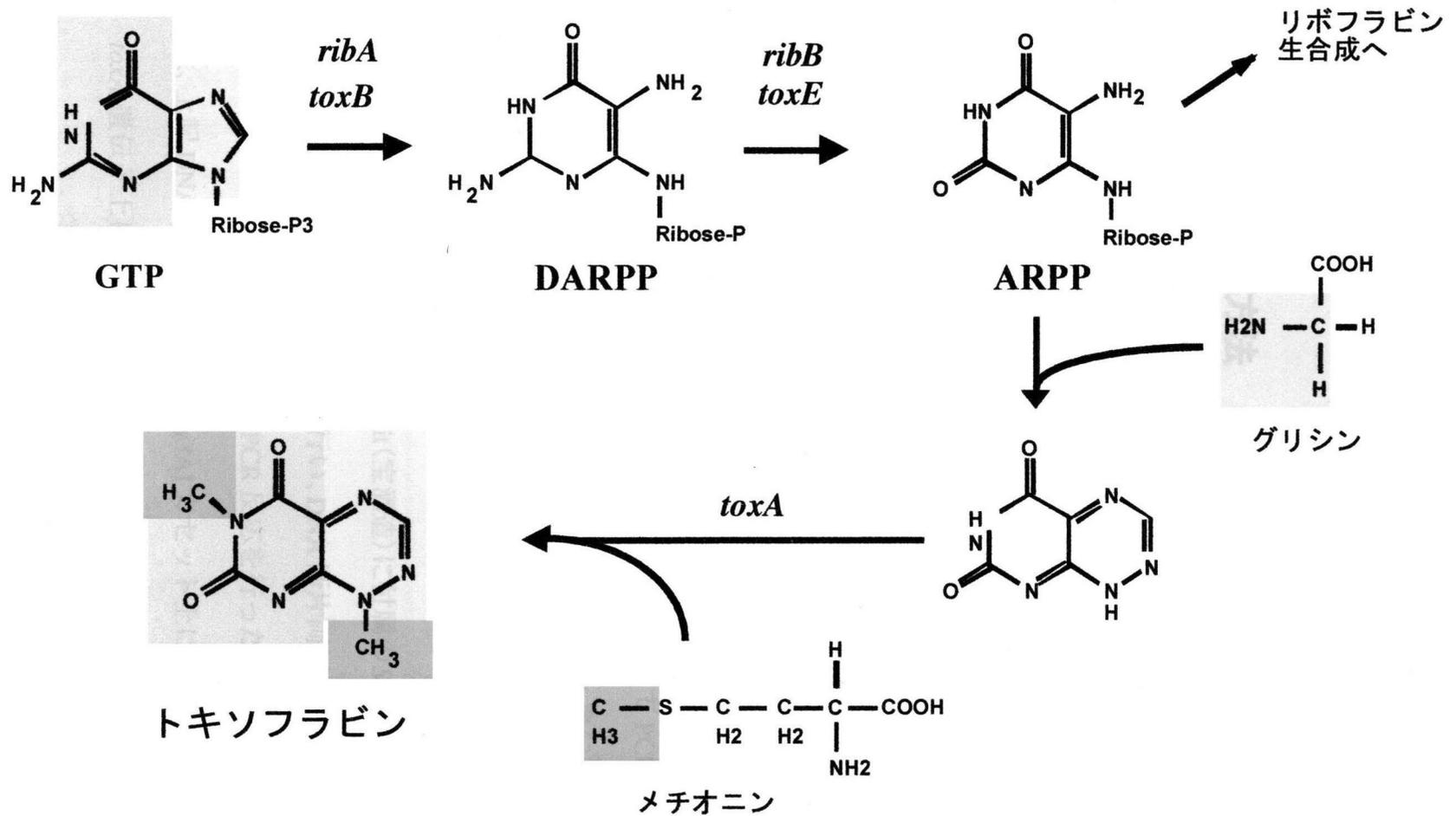
第 II 章 トキソフラビン生合成遺伝子系の解析

前章の研究において、イネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) の病原性には、トキソフラビンが必須の因子であることが明らかになった。そこで、トキソフラビン生合成の機構、およびその生合成遺伝子の発現抑制を解明することを試みた。トキソフラビン生合成遺伝子に関しては、これまで、メチル基転移酵素をコードする *toxA* 遺伝子が単離されており (Suzuki et al., 1988a)、この遺伝子を破壊した変異株では、病原性が低下することが報告されている (Suzuki et al., 1988b)。さらに *toxA* 遺伝子下流に GTP シクロハイドロラーゼをコードする *toxB*、W-D リPEATタンパク質をコードする *toxC*、機能未知の *toxD*、デアミナーゼをコードする *toxE* 遺伝子が存在し、これらが、ゲノム上でクラスターを形成することが示唆されている (鈴木ら, 1999)。しかし、それら遺伝子の具体的な機能、および生合成の制御遺伝子等については、解明されていない。

また、鈴木らの得た *toxB*, *E* 遺伝子がそれぞれリボフラビン生合成経路に使用される *ribA*, *B* 遺伝子と相同性が高いことから、トキソフラビン生合成経路は、グアノシン三リン酸 (GTP) から始まるリボフラビン生合成経路 (Bacher et al., 1996; Richter et al., 1997) と、同様のステップを経ると考えられた。

以上の報告とリボフラビン生合成経路を参考に、推測したトキソフラビン生合成関連遺伝子とその予想経路を図 25 に示す。

本章では、上記の *toxA* 遺伝子およびその周辺未知 DNA 領域を解析し、新たなトキソフラビン生合成遺伝子および制御遺伝子について明らかにすること



70

図25. トキソフラビン合成関連遺伝子とその予想経路図
 DARPP: 2,5-diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinone-5'-phosphate
 ARPP: 5'-amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione-5'-phosphate

を目的として研究を行った。

実験材料及び方法

1. 供試プラスミドおよびプライマー

本研究に供試した菌株およびプラスミドは表 5 に、プライマーは表 6 に示した。

2. 遺伝子クローニング法

イネもみ枯細菌病菌からの *toxA* 遺伝子の単離は、既知の塩基配列を基に *toxA* 遺伝子上流および下流に、tp1 および tp2 プライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型として LA Taq ポリメラーゼ（宝酒造社）を用いて PCR 法を行い、*toxA* 遺伝子全長を含む約 1.1 kb 断片を増幅した。一方、*toxA* 遺伝子上流および下流の DNA 領域の単離には、ゲノム DNA を制限酵素 *Bam*HI で完全消化後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製し、この *Bam*HI DNA 断片に LA PCR *in vitro* Cloning Kit (宝酒造) に付属の *Sau*3AI カセット液を加え、4 °C にてライゲーション反応を行い、DNA 断片両側にカセットを有する反応物を作成した。これを鋳型として PCR 反応を行った。*toxA* 遺伝子上流 DNA 領域は、上記 DNA を鋳型として、*Sau*3AI カセット上に設計した C1 プライマーと、*toxA* 遺伝子上に設計した SP1U プライマーの組み合わせで PCR を行い、

表 5. 供試菌株およびプラスミド

菌株およびプラスミド	特性
<i>Burkholderia glumae</i> MY411	<i>toxR</i> 遺伝子破壊株、Km 耐性
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLYS	タンパク質大量生産用、Cm 耐性
pTMG	プライマー tp1-tp2 で増幅した <i>toxA</i> 遺伝子を含む 1.1 kb 断片を挿入した pGEM-T easy vector
pBG10	プライマー SP2D-C2 で増幅した <i>toxA</i> 遺伝子下流領域を含む 2.9 kb 断片を挿入した pGEM-T easy vector
pBG26	プライマー SP2U-C2 で増幅した <i>toxA</i> 遺伝子上流領域を含む 2.5 kb 断片を挿入した pGEM-T easy vector
pUC411	プライマー tp5-tp6 で増幅した <i>toxA</i> 遺伝子内部の 650 bp 断片を <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III サイトに挿入した pUC18
pMY411	pUC411 の <i>Hind</i> III サイトに pR2YE の Km 耐性遺伝子 1.3 kb を挿入したもの
pET23a	大腸菌用大量発現ベクター
pMY421	プライマー <i>toxR</i> 1- <i>toxR</i> 2 で増幅した <i>toxR</i> 遺伝子の全長 900 bp を挿入した pET23a
pTMG14	プライマー tp1-SP1U で増幅した <i>toxA</i> 遺伝子のプロモーター配列近傍領域を挿入した pGEM-T easy vector

表 6. 供試 PCR プライマー

プライマー	塩基配列(5' - 3')
tp1	AGTGAAAGTATGGCTGGC
tp2	GTTCGGGAGATACGCGCG
SP1U	TCGCGCGCACCCACCTTGAACATCT
SP2U	TTGCCGCCATTCATTTTCGAG
SP1D	GAGGTCCGCACGATTTTCCACATG
SP2D	ACTTCGAATGGCAAAGCCG
tp5	TTTAAGCTTCAACGACCCGCTGCTG
tp6	TTGGATCCGGAAACGGCGGATCGAA
tb3	TAGTAGCTGCCGGTGGCGATG
tb4	AAGGCGCACGACGCCGGCGTG
tu5	AAAGGATCCATGAATAATCTGAAGCGGAT
tu6	AAAAAGCTTTCAGCGGTTCGCGCACCCACC
rib1	TCTGGCAATCGAACGCATGGCC
rib2	GACCTACTACCAGAACGACGGC
npt1	ATGGATTGCACGCAGGTTCTCCG
npt2	AAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCG

再度その反応産物を、C1 プライマーより内側に設計された C2 プライマーと、SP1U プライマーより内側に設計された SP2U プライマーの組み合わせで、PCR を行い取得した。同様に、*toxA* 遺伝子下流 DNA 領域は、C1 プライマーと *toxA* 遺伝子上に設計した SP1D プライマーの組み合わせで PCR を行い、再度その反応産物を、C2 プライマーと SP1D プライマーより内側に設計された SP2D プライマーの組み合わせで PCR を行い取得した。これらの増幅 DNA 断片を pGEM-T easy vector (プロメガ) に結合し、大腸菌へ形質転換した後、シークエンスの決定に用いた。

3. 遺伝子破壊用ベクターの構築

toxA 遺伝子上流の推定 ORF 破壊のための、遺伝子破壊用ベクターの構築を行った。まず、推定 ORF の 5' および 3' 末端から、それぞれ約 150 bp 内側に設計した tp5 および tp6 プライマーを用いてゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、得られた約 650 bp の増幅断片を、プライマー末端に設計した *Bam*HI および *Hind*III 制限酵素で切断し、pUC18 へ導入し、pUC411 を構築した。この pUC411 の *Hind*III サイトへ pR2YE の Km 耐性遺伝子 1.3 kb 断片を結合し、遺伝子破壊用ベクター pMY411 を構築した。

4. 大腸菌におけるタンパク質生産

toxA 遺伝子上流に見出された推定 ORF のタンパク質を生成するため、pET23a (Novagen) の T7 プロモーターから転写、翻訳されるタンパク質とのフレームが合うように、推定 ORF の開始コドンと終止コドンを含む領域に、プライマー

tu5 および tu6 を設計し、PCR 反応を行った。得られた DNA のプライマー末端に設計した *Bam*HI および *Hind*III で切断後、pET23a の *Bam*HI-*Hind*III サイトへ連結し、大量発現用ベクター pMY421 を構築した。このベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS (東洋紡) へ導入し、OD₆₀₀= 0.6 まで培養した後、IPTG を添加して再度 OD₆₀₀= 1.2 になるまで培養を続けた。大腸菌体を集菌し、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) へ懸濁後、SonifierII model 450D (ブランソン) による超音波処理を 1 分間行って細胞を破碎し、遠心分離により上清と沈殿に分画した。沈殿分画は、尿素バッファー (8 M 尿素、10 mM Tris-HCl) を加えて 15 分間振盪させて沈殿物を溶解させた後、再び遠心分離により不溶性物質を取り除き、この上清を実験に用いた。タンパク質溶液はブラッドフォード法 (Bradford, 1976) により定量した。サンプルは 12 %の SDS-アクリルアミドゲルで 25 mA で電気泳動を行った後、クマシーブリリアントブルー R 250 溶液で染色し、タンパク質を確認した。

5. ゲルシフト法

イネもみ枯細菌病菌を King's B 液体培地で 20 時間培養した後、集菌した菌体を、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) へ溶解し、超音波処理を 3 分間行い細胞を破碎した。遠心分離により細胞片を除き、その上清液をタンパク質溶液とした。

一方、前述した *toxA* 遺伝子を含む 1.1 kb DNA 断片をテンプレートとして、tp1 プライマーと *toxA* 遺伝子上の SP1U プライマーを用いて、*toxA* 遺伝子上流領域を PCR 増幅後、その約 400 bp DNA 断片を、pGEM-T easy vector に連結し、

pTMG14 を作成した。このプラスミドを鋳型として IRD41 ラベルのリバースプライマー（アロカ）と tp1 プライマーを用いて PCR 反応を行い、IR 標識 DNA を作成した。

上記の $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ タンパク質溶液 $2 \mu\text{l}$ に、 $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ IR 標識 DNA $2 \mu\text{l}$ 、 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ poly (dI-dC)·poly (dI-dC) (アマシャムファルマシアバイオテック) $0.5 \mu\text{l}$ 、 $5 \text{ mg}/\text{ml}$ BSA $0.5 \mu\text{l}$ 、 1 mM Tris-Hcl (pH 7.5) $1 \mu\text{l}$ 、 20 mM EDTA (pH 7.5) $1 \mu\text{l}$ 、グリセロール $1 \mu\text{l}$ 、 1% Triton X-100 $1 \mu\text{l}$ 、 20 mM DTT $1 \mu\text{l}$ を加えた全量 $10 \mu\text{l}$ で $37 \text{ }^\circ\text{C}$ にて 15 分間反応した。反応液にゲルシフト用ローディングバッファー (10% グリセロール、 0.05% ブロモフェノールブルー) を加えて、 4% アクリルアミドゲルで Licor 4200 (アロカ) の 25 cm ゲル板を用いて 1000 V 、 25 mA で 4 時間電気泳動後、画像を解析した。

結果

1. トキソフラビン合成遺伝子の単離・同定

イネもみ枯細菌病菌の野生株ゲノム DNA について、*toxA* 遺伝子 735 bp の全長を含む約 1.1 kb の DNA 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。その結果、*toxA* 遺伝子内に切断点をもたない制限酵素 *Bam*HI および *Hind*III にてゲノムを切断した場合に1つのバンドを示したことから、*toxA* 遺伝子は本菌のゲノム中に1コピーで存在することが明らかとなった。また、*toxA* 遺伝子周辺の制限酵素地図を作製した結果、図 26 に示すように、*toxA* 遺伝子内部の *Eco*RI サイトから、上流および下流共に約 3 kb の位置に *Bam*HI サイトが存在することが明らかとなった。

そこで、*toxA* 遺伝子の上流および下流に存在する *Bam*HI サイトまでの DNA 断片をカセット PCR 法によって増幅したところ、それぞれ約 2.5 kb および約 2.9 kb の DNA 断片が得られた。それぞれの DNA 断片の塩基配列を決定することによって、*toxA* 遺伝子の一部およびその周辺 DNA 領域がクローニングされていることを確認した。*toxA* 遺伝子の下流領域には、*toxB* および *toxC* 遺伝子と推定される2つの ORF が見出された。最初の ORF は、図 27-4 に示すように塩基番号 3714 から 4208 で、*toxA* と同方向の 495 bp からなり、*toxA* 遺伝子の終止コドンより 155 bp 下流に位置した。もう一つの ORF は、塩基番号 4293 から 5894 で、*toxA* と同方向に 1602 bp からなり、*toxB* 遺伝子終止コドンから 85 bp 下流に位置した。これらの ORF は塩基配列の比較から、それぞれ *toxB* および *toxC* であることが明らかとなった。ToxB および ToxC の推定アミノ酸配列の相同性を GenBank データベースを用いて検索した

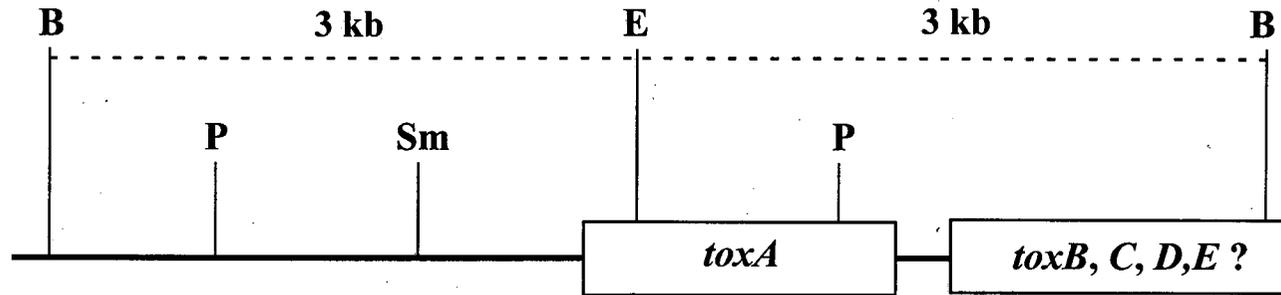


図26. *toxA*遺伝子周辺の制限酵素地図
E: *EcoRI*, B: *BamHI*, P: *PstI*, Sm: *SmaI*

*Pst*I

GCTGGTGACCCTGCAGGCCCTGATGACGGAGAAGCACATCTCTCGCACCGCCATGCGCCT 1320
L V T L Q A L M T E K H I S R T A M R L

GCACAAGAGCCAGCCGGCGATCAGCCATGCGCTGGCGCATCTGCGCGACATCTTCAACGA 1380
P L L V R R G G G L E L T S R A S E L M tp5プライマー

CCCGCTGCTGGTGAGGCGGGCGGGGGGGCTGGAGCTGACCTCGCGCGCCAGCGAACTGAT 1440
Q P L S D A L D Q L S A L L E P P E F D

GCAGCCGCTGTGCGACGCGCTGGACCAGCTCAGCGCGCTGCTCGAGCCGCCGAGTTCGA 1500
H K S Q P A I S H A L A H L R D I F N D

TCCCTCGCAGGCGCAGCGCGTGTTCGCGTGTTCGATTACGGCGCGCGCATCGT 1560
P S Q A Q R V F R V S M S D Y G A R I V

GCTGCCAAAGCTGGTGGCATGCTGCGCGGAACGCGGGGCATCGAGCTGGTGGTCAG 1620
L P K L V R M L R A N A R G I E L V V S

CCAGGCCAATCGCGAGGCGATGCGCATGCAGGTGATGGACGGCGAGGTTCGACCTCGCGCT 1680
Q A N R E A M R M Q V M D G E V D L A L

CGGCGTGTTCGCCGCCGCTCCCCGAGCTGCACACCGAGACGCTGTTGCTCGAGACCTT 1740
G V F P P P S P E L H T E T L F V E T F

CGCCTGCCTGGCCGACGCGGCCAGCATGCCGGCCTCGCGCATGCTCGACCTGGAGGCCTG 1800
A C L A D A A S M P A S R M L D L E A W

GCTGGCGCGCCCGCATGCGCTGGTGGCGATGCGCGCCGGCACCGACAACGAGATCGACCG 1860
L A R P H A L V A M R A G T D N E I D R

CGCGCTCGCAAATTGCGGCCGAGCGCGCATCGCGGTGATCCTGCCGCACTGGGGCGTGGC 1920
A L A N C G R A R I A V I L P H W G V A

CAACGAGTTGGTTCGTCGATACCGACCTGGTGTGCTGACGGTGGCGCGGCGCAACCTCGACCG 1980
N E L V V D T D L V L T V A R R N L D R

GTGCGCGACGACGCGCGCTGTGTATTCGATCCGCGTTTCCGGTTCGAATCCTTCGAGTT 2040
C A T T H G C V F D P P F P V E S F E F tp6プライマー

TCAGCAAATGTGGCATCAGCGCCGGCAGGGCGACCCCGCACAACTGGCTGCGCCAGAT 2100
Q Q M W H Q R R Q G D P R T T W L R Q M

GATCGCGCGGGTGGTGGCGACCGCTGATTCCCGCCCGCGCTGCGGGCGGGCTTTCCCT 2160
I A R V V R D R *

TCGCTTTTCCACCGCGGCCGCTTTCCGGCGTATTGAATAGCCGGCCCCGTCGAGGT 2220
*Sma*I

AATTGCACGGGGCTTTGCCATTTTCTAATTATTTCTGATCTTGAATTGGATATTTGCGGG 2280

CCATGCTTTTTGTTATGCATTTTCGCATGAAGACGCAAGCGTCGTGAGTTGATGTCGGGAG 2340

TGGGTGGATTGCAATGCGGCTATCCGGCATCTCACGCCGATGCCGGTGCGAACCCCGGA 2400

図27-2. トキソフラビン生合成遺伝子群の塩基配列 (1261-2400)

*toxR*遺伝子は1228から2127

短い矢印はORFの方向、長い矢印はプライマー部位、点線は制限酵素部位

*は終止コドン

tp1プライマー

TTCGATTGGGAAATCCGCGTCGTGAATAGTGAAAGTATGGCTGGCTATGAAAATTCCTCG 2460

SP2Uプライマー

AAATGAATGGCGCAATTCATTCAAAGAATTTCAAGGGTGCAATTCACGTGGATATAATC 2520
-35 -10

CGCTTCCATTGGATGAAATAATTAATAATCCAGCCCATTCCGAGGGAACATAGTGGCATT 2580

TTGTTATGAATATTCATGGCGAACTTGCTGAATCATGAATCTGCTAGATAAAGGAGGAGG 2640

CGAATATCGATAGTTCTGGATAAGCAGCCGATTGGCCCATCGATAGTGATTCCGTTGATA 2700

toxA

TTGAAAGGTTACGATGAGTACGACAGCTCGATACGATTTCGATTGGCGGATTGTTTGAGG 2760
M S T T A R Y D S I G G L F E D

SP1Dプライマー

ATTTACGCAATCCGCCGCGCAGGCCATCGAGGTCCGCACGATTTTCCACATGATTGGTG 2820
F T Q S A A Q A I E V R T I F H M I G D

ACGTTTCCGGCAAGTCGGTGCTGGATCTGGCTTGGCGATTTCGGTTTTTTCGGGCGTGAAA 2880
V S G K S V L D L A C G F G F F G R E I

TCTATCGGCGCGGCGCGGCCAAGGTGGTTCGGCGTGGATATCTCCGAGAAGATGATCGAGC 2940
Y R R G A A K V V G V D I S E K M I E L

EcoRI

TGGCCCGTGAGGAGTCGCGCAATACGGCGATCCGCTCGAATTCACCGTGGCGGACGTTGG 3000
A R E E S R K Y G D P L E F H V R D V A

CCAACATGGAGCCGCTCGGGCAATTCGACCTGGTCAATGCCGCTGGCTCTTCAATTACG 3060
N M E P L G Q F D L V N A A W L F N Y A

SP1Uプライマー

CGGATTCCGGTCGAGAATCTGCGCAAGATGTTCAAGGTGGTCCGCGGAGCCTGAAGCCGG 3120
D S V E N L R K M F K V V R A S L K P D

ACGGCAAGCTGGTGGCTATAACCGTCGACCCGGATTTTTCGCTGGCCAAGGGCAATTCG 3180
G K L V A Y T V D P D F S L A K G N F A

CGAAATACGGCGTGAACGTGCTCAACGAGCGCGCCTGGGGGCGGGCTATCGCCACGATG 3240
K Y G V N V L N E R A W G P G Y R H D A

CCGAGTTCGTGACCGATCCGCCAGCCAGTTCAGCTTCTACCGCTGGAGCCGCGCGGATT 3300
E F V T D P P S Q F S F Y R W S R A D Y

SP2Dプライマー

ACGAAAGCGGATCGCCGATGCGGGTTTTAGCCACTTCGAATGGCAAAAGCCGCTGCTCG 3360
E S A I A D A G F S H F E W Q K P L L E

AGGCCGACGACATCGCCACCCATCCGCCCGGCTTCTGGGACGTGTTCCAGAACAACCTGCC 3420
A D D I A T H P P G F W D V F Q N N C L

PstI

TGCAGACCGGCTGGTCTGCAAGCCTTGATATGCCAGGGGCGGTTGATCCGCCCCATTC 3480
Q T G L V C K P *

GTCCAGACTCTGCGCAAATCGCCAGGGCATAACAGCCCGTTAGCGTGTCTATCGATGCGC 3540

tp2プライマー

CGGTATCTCCGAACCTGAGAGGCCGAGCCATGAATCAATCCGATGATCATTCCGGTGTG 3600

図27-3. トキソフラビン生合成遺伝子群の塩基配列 (2401-3600)

*toxA*遺伝子は2715から3449

短い矢印はORFの方向、長い矢印はプライマー部位、点線は制限酵素部位

*は終止コドン、下線部は*toxA*遺伝子プロモーター

```

AGCATCCGCACACGCATCAAGGTGCCGATTTCGTCCGCGTTTCGAGCGCGACGGCATTGAA 3660
ACCGAGATGGTGACCTTCAACGGTCTTTGCGACACGCCGAACATATCGCGCTGTGTTTCG 3720
                                     toxB →
                                     V F G
GCAAGATCGGCGAGGCGCCGCTGGTGCGCCTGCATTCCGAGTGCCTGACGGGCGACGTGT 3780
K I G E A P L V R L H S E C L T G D V F
TCGGCTCCGCGCGCTGCGACTGCGGCGAGCAGCTCGACGAGTCGATCGCGCTGTTTCGGCG 3840
G S A R C D C G E Q L D E S I A L F G E
AGCGCGGCGGCATCCTGCTCTACCTGCGCCAGGAAGGGCGCGGCATCGGGCTCTACAACA 3900
R G G I L L Y L R Q E G R G I G L Y N K
AGCTCGACGCCTATCGCCTGCAGATCTCGCAGGGACTCGACACCTTCGCTGCCAATCGCG 3960
                                     PstI
L D A Y R L Q I S Q G L D T F A A N R A
CGTCAACTTCCCCGACGACCTGCGCGACTTCCGCGTGGCGGCCAGATGCTCAAGGCGC 4020
L N F P D D L R D F R V A A Q M L K A L
TCGGCGTCCGCGAGGTCTCGCTGGTCACCAACAACCCCGACAAGACCGCGCAACTGACCC 4080
G V G E V S L V T N N P D K T A Q L T R
GTCACGGCATCAAGGTGCGCCAGGTGAAGTCGACCGGCGTGTTCGCCAACAGCGTCAACT 4140
H G I K V R Q V K S T G V F A N S V N F
TTGTTATCTGCATGCGAAGGCGACCCAGCACCGGCATGCCATCAAGCTCAACGGAGAAA 4200
G Y L H A K A T Q H R H A I K L N G E M
TGCAATGATTGCCCATCGCAGCCCGATCAGCGGCATCGCCTCCACCGCGACCAGTACGTG 4260
Q *
                                     toxC →
CTGACGGCCCGCTACGACAATCAGGTGATCCTGTGGGACGCGAAGACGCAACAGCCGCTG 4320
                                     V G R E D A T A A G
GCGCGCGCGATGCACGATCATCTCGCCAACCAGGGCGCGTTCCTCGCCGAACGGACCTACG 4380
A R D A R S S R Q P G R V L A E R T Y V
TGTTGACTTCCTCGTCCGACTACACCGCGCTCTCTGGACCGTGCCGAACCTGCGCCTGG 4440
V T S S S D Y T A R L W T V P N L R L V
TCGGGTGTTTCGCCGACCAGGAGGACGACGTCGAGATGAGCGTGTTCATCCGTCCAAGC 4500
A V F A D Q E D D V E M S V F H P S K P
CGCTGGTGGCCACCGCTTCACGGGACCATCGCGTGCAGTCTATGACTTCTCCGGCCGGC 4560
L V A T A S R D H R V R V Y D F S G R L
TGTTGACAGACCTTCGAGGGGCACACGGCCGACGTCATCTCGGTTCGAGTGGATGAGCGATG 4620
V Q T F E G H T A D V I S V E W M S D A
CCGACGAGCTGGTCTCCTCGAGCGACGACGGCACCATCAAGCGCTGGTCACTTGCCACCG 4680
D E L V S S S D D G T I K R W S L A T G
GCGGCCTGGTCCGGGACATCGACCTGAACGGCATCGAAACCGACACCATCGTGATCGCCC 4740
G L V G D I D L N G I E T D T I V I A P

```

図27-4. トキソフラビン生合成遺伝子群の塩基配列 (3601-4740)

toxB 遺伝子は3714から4208, *toxC* 遺伝子は4293から5894

短い矢印はORFの方向、長い矢印はプライマー部位、点線は制限酵素部位

*は終止コドン

CGGACAGCCGCATCTTCGCCGGCAACGACGAAGGCGAGATCATCATGATCGACGGCGATC 4800
D S R I F A G N D E G E I I M I D G D R

tb4プライマー

GGCGCACCCACCTCAAGGCGCACGACGCCGGCTGAAGCGGCTGGTGCTGGACGGCCGGC 4860
R T T L K A H D A G V K R L V L D G R R

GCGGCTGCTGGTGTGCTCTCCTACGACCGCACCATGCGGCTGTGGAAGGTGCGGCGAGG 4920
G L L V S L S Y D R T M R L W K V G E G

GCGTGCCCGAGGCCAGCGGCAGCACACAGTTGCCGCCCGAGGTATGGCCGCGTTCCTGCT 4980
V P E A S G S T Q L P P E V W P R S C S

CGTTCGAGGGCGACGACCACATCGTGTTCTCGACCTTCCATTCCACCTACCGCCGCTACA 5040
F E G D D H I V F S T F H S T Y R R Y N

ACTGGAAGCTCTCGCGCTGGGACACCAGAGAGATCGCGCCGACCCACGGTGCCAACGCGG 5100
W K L S R W D T R E I A P T H G A N A A

CGATCGCGATCGACGGCAAGGTCTGGACCGTCCGGCGATGCTGGCGTGGTGC GCGTGGACG 5160
I A I D G K V W T V G D A G V V R V D G

GCGTGGAGCATGCGAACACGCACAGCCTCTGCAACTTCTCACGGTGGCGGGCGACGTGG 5220
V E H A N T H S L C N F L T V A G D V V

TGCTCACCGGGCGGCCAGCTCGGCAAGGTGTTGATGCGCGCAACGGGGCGGAGCTCTACC 5280
L T G G Q L G K V F D A R N G R E L Y Q

AGCATCGCTCGCCGCTCAACTGCGCGGCCAGCTTCGAGCACGAGGGCGTGACGCATGCGA 5340
H R S P L N C A A S F E H E G V T H A I

TCGTGCGCGCCTATACCGCGAGGGCATCGTGCTGCGCATCGAGGGCGACAAGGTGCGCC 5400
V G A Y T G E G I V L R I E G D K V R H

ACGTGCGCGACCTGCCGCTGCATCCGAATGCGGTGAAGGGCGTGGCGCGCTCGGGCGACC 5460
V R D L P L H P N A V K G V A R S G D L

TGCTGTTCTCGGTGGCGGGCCGATGCCTCGGCCACCTGGGTGCGCTGCTCGACGCTGGAGA 5520
L F S V A A D A S A T W V R C S T L E I

TCGTGCGCCACGCTGCCCGATGCGCACGACAAGATCGCCAACGGCTGCGCCGGTCTCGGGC 5580
V A T L P D A H D K I A N G C A G L G E

AGGGCTACTTCGCCTCGATCAGCCGCGATCTCAAGCTGCGGATCTGGTGC GCGCCGACCAGC 5640
G Y F A S I S R D L K L R I W S P D Q Q

AGGTGCAATCGATCGACACGCCGCATACGCATTCGATCAAGTGCGTGAGTGC GAGCGGGC 5700
V E S I D T P H T H S I K C V S A S G D

tb3プライマー

ATGGCCGTTACATCGCCACCGGCAGCTACTACGGGCGCGTGGCGATCTACGGCCGCGTCC 5760
G R Y I A T G S Y Y G R V A I Y G R V E

AGCGGCGCTGGAGCTTCGATGCGCGCGTGAGCACGGCGGGCGTGTCTCTCGCTGAGCTTCG 5820
R R W S F D A R V S T A G V S S L S F D

ATCCGCTGTGCGGGCATTTCCTCGCCAGCTCCTACGACGGCCAGGTTTACCGCGTGCCGG 5880
P L S G H F L A S S Y D G Q V Y R V P A

CGATCCCGCGCTGAAGCCGGTCCGGCCGGCGCTGCCGGCCGACTTTCGTTCAAGCGCG 5940
I P R *

図27-5.トキソフラビン生合成遺伝子群の塩基配列 (4741-5940)

短い矢印はORFの方向、長い矢印はプライマー部位、点線は制限酵素部位
*は終止コドン

CGACGGCTGACTGCGCGGATTTGCCCATCCGATCCTGCAATCGACTGCTACCGATCATG 6000
 ACCATCAAGTTGGCTGACAATCCGAACCGCCTCACCGATCGCGAGGCAATGGGCCTGCCC 6060
 GAAACCTTCGTCGCGCGCACGCCGTCCGCGCTGCTGGCCGGCCACGAGGACCTGCTCGGC 6120
 GCCGGCGCGCCGTGCCTGGGTGAAATCGCCGAGGATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAC 6180
 *Bam*HI
 GCGTTCTAACGGATCC 6196
 - - - - -

図27-6. トキソフラビン生合成遺伝子群の塩基配列 (5941-6196)

点線は制限酵素部位

ところ、*toxB* 遺伝子は様々な微生物のリボフラビン生合成に用いられる GTP シクロヒドロラーゼ II と高い相同性を示した (表 7)。また *toxC* 遺伝子はシアノバクテリアの W-D リピートタンパク質と僅かながら相同性を示した (表 8)。

一方、*toxA* 遺伝子上流領域には、3つの ORF (ORF 1, 2, 3) の存在が認められた。ORF1 は、図 27-1, -2 に示すように、*toxA* と同方向で 900 bp からなり、*toxA* 遺伝子の開始コドンより約 600 bp 上流の、塩基番号 1228 から 2127 に位置した。ORF2 は、図 27-1 に示すように、*toxA* と逆方向の 618 bp からなり、ORF1 開始コドンより 94 bp 上流の、塩基番号 515 から 1132 に位置した。ORF3 は、*toxA* と逆方向の不完全長の ORF で、ORF2 の終止コドンから -1 塩基の位置に存在した。ORF1 および ORF2 の推定アミノ酸配列における相同性を検索したところ、ORF1 は LysR ファミリーの転写活性因子と高い相同性を示した (表 9)。この ORF1 を *toxR* と命名した。そこで、代表的な LysR ファミリーの *Rhizobium leguminosarum* の *NodD*、*Pseudomonas putida* の *NahR* および *MexT* に対して *toxR* 遺伝子の推定アミノ酸配列でアライメントを行ったところ、遺伝子全体では約 15 % 程度の相同性を示し、各配列とも N 末端側が比較的高く保存されており、他と同様に DNA 結合モチーフであるヘリックスターンヘリックスモチーフが存在したことから、ToxR タンパク質は LysR ファミリーに属することが示唆された (図 28)。

また、ORF2 (*orf2*) は、機能未知の数種の細菌のタンパク質と相同性を示した (表 10)。これらの遺伝子は、各菌における *toxR* 遺伝子の相同性遺伝子に対して逆向きに存在し、かつ隣接または重複していることが明らかと

表 7. *tox*B 遺伝子と各微生物の GTP シクロヒドロラーゼ II 遺伝子とのアミノ酸レベルにおける相同性

微生物	遺伝子	相同性(%)		Accession No.	参考文献
		Identify	Similarity		
<i>Vibrio cholerae</i>		62	75	NP_230908	Heidelberg et al., 2000
<i>Streptomyces coelicolor</i>		61	73	NP_626921	Bentley et al., 2002
<i>S. avermitilis</i>	<i>ribA4</i>	61	72	NP_821720	Omura et al., 2001
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		59	75	NP_798300	Nasu et al., 2000
<i>Photobacterium leiognathi</i>	<i>ribA</i>	59	72	AAK83295	Lee et al., 1994
<i>P. phosphoreum</i>	<i>ribA</i>	59	71	P51618	Lin et al., 2001
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>ribA</i>	55	67	NP_819677	Seshadri et al., 2003
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>		55	67	ZP_00017753	
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>ribA</i>	54	66	NP_561484	Shimizu et al., 2002
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>ribA</i>	52	66	NP_357756	Hoskins et al., 2001

表 8. *toxC* 遺伝子とアミノ酸レベルで相同性を示したタンパク質

タンパク質	微生物	相同性(%)		Accession No.	参考文献
		Identify	Similarity		
hypothetical protein	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	25	45	ZP_00073380	Kaneko et al., 2001
WD-40 repeat protein	<i>Nostoc sp.</i>	25	41	NP_486164	
WD40 repeat	<i>Nostoc punctiforme</i>	24	43	ZP_00110163	
WD-40 repeat protein	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	24	42	NP_681279	

表 9. *toxR* 遺伝子とアミノ酸レベルで相同性を示したタンパク質

タンパク質	微生物	相同性(%)		Accession No.	参考文献
		Identify	Similarity		
LysR family transcriptional regulator	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	47	64	NP_745744	Nelson et al., 2002
transcriptional regulator	<i>Ralstonia metallidurans</i>	49	63	ZP_00025573	
transcriptional regulator	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	47	60	ZP_00084896	
transcriptional regulator	<i>Ralstonia metallidurans</i>	43	58	ZP_00025157	
probable transcriptional regulator	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	37	53	NP_252011	Stover et al., 2000
transcriptional regulator	<i>P. aeruginosa</i> PA14	37	53	ZP_00136688	
transcriptional regulator	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	43	55	ZP_00007249	Kohler et al., 1999
transcriptional regulator MexT	<i>P. putida</i> KT2440	33	47	NP_744970	
TtgS protein	<i>P. putida</i>	33	47	CAD59442	
putative LysR-type regulator	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	36	51	NP_435433	Barnett et al., 2001 Galibert et al., 2001

		10	20	30	40	50
NodD	MR---	FKGLD	LNLLVALDAL	MTERKLTAAA	RSINLSQPAM	SAAIGRLRAY
ToxR	MN--	NLKRID	LNLLVTLOAL	MTEKHISRTA	MRLHKSQPAT	SHALAHLRDI
NahR	M---	ELRDL	LNLLVVFNEL	LVCRRVSIIV	ENLGLTQPAV	SNALKRLRTA
MexT	MNRNDLRRVD	LNLLIVFETL	MHERSLTRAA	EKLFLGQPAT	SAAISRRLTL	
				ヘリックスターンヘリックスモチーフ		
		60	70	80	90	100
NodD	FNDELFLMQQ	RRLVPTPRAE	ALAPAVREAL	LHIQLSVIAW	DPLVPAESDR	
ToxR	FNDPLLVRRG	GGLELTSRAS	ELMQPLSDAL	DQLSALLE-P	PEFDPSQAQR	
NahR	LQDQLFVRTY	QGMEPTPYAA	NLAEPVALAM	HALREALQHH	ERFDPLTSEK	
MexT	FDDPLFVRTG	RSMEPTARAQ	EIFAHLSPAL	DSISTAMSRA	SEFDPATSTA	
		110	120	130	140	150
NodD	RFRIVLSDFM	TLVFEKVIK	RVAREAPGVS	FELLHVNDP	-DERLRSGDL	
ToxR	VERVSMSDYG	ARIVLPKLV	MLRANARGIE	LVVSQANREA	MRMQVMDGEV	
NahR	TFTLAMTDIG	EIYFMPRLMD	AITLQAPNCA	ISTVRDSSMS	LMQALQNGTV	
MexT	VERIGLSDDV	EFGLLPLLR	RLRAEAPGIV	LVVRRANYLL	MPNLLASGEI	
		160	170	180	190	200
NodD	DFLILPDQFM	SATHPSAKLF	EDKLVCVGCP	SNQQLRGKLS	LKRFMSMGHV	
ToxR	DLALGVFPPP	SPELHTETLF	VETFACLADA	ASMPASRMLD	LEAWLARPHA	
NahR	DLAVGLLPNL	QTGFFQRRLL	HNHYVCLCRK	DHPATREPLT	LERFCSYGHV	
MexT	SVGYS-YTDE	LPANAKRKTV	RRSKPKILRA	DSARG--QLT	LDYCARPHA	
		210	220	230	240	250
NodD	AAMEGRTLKP	SIEQWLLLEH	GFKRRVEIVV	PGFNSIPMLL	QGTNRIATLP	
ToxR	LVAMRAGTDN	EIDR-ALANC	GRAR-IAVIL	PHWGVANELV	VDTDLVLTVA	
NahR	RVIAAGTGHG	EVDTY-LTKA	GIRRDIREV	PDFVAVGHIL	QRTELLATVP	
MexT	LVSFAGDLSG	FVDE-ELEKF	GRKRKVVLA	PQFNGLGTLL	AGTDIATVP	
		260	270	280	290	300
NodD	LLLVRHFEP	IPLQIVDHPL	PPLSFEALQ	WPLLHNSDPG	NIWMRNILE	
ToxR	RRNLDRGATT	HG-CVFDPPF	PVESFEFQOM	WHQRRQGDPR	TTWLRQMI--	
NahR	IRFADCCVEP	FGLSVLPHPV	ALPEIAINMF	WHAKYHODLA	NIWLRQLMFD	
MexT	DYAAQALIAA	GGLRAEDPPE	ETRAFELSMA	WRGAQNDPA	ERWLSRI--	
		310	320			
NodD	EASRIETSSE	RCSQEPRATQ	SW			
ToxR	--ARVV--RD	R-----	--			
NahR	LFSD-----	-----	--			
MexT	--SMFIGDPD	S-----	-L			

図28. ToxR推定タンパク質とLysRファミリータンパク質との相同性

NodD: *Rhizobium leguminosarum*, NahRおよびMexT: *Pseudomonas putida*

網掛け部位はアミノ酸配列の一致

図中の四角はヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフ

表 10. *orf2* 遺伝子と多種タンパク質遺伝子とのアミノ酸レベルにおける相同性

タンパク質	微生物名	相同性(%)		Accession No.	参考文献
		Identify	Similarity		
hypothetical protein	<i>Ralstonia metallidurans</i>	48	63	ZP_00025577	
hypothetical protein	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	43	58	ZP_00007248	
Uncharacterized protein	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1	34	54	ZP_00084895	
hypothetical protein	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	39	51	NP_252010	Stover et al., 2000
conserved hypothetical protein	<i>P. putida</i> KT2440	46	60	NP_745745	Nelson et al., 2002
unknown proteins	<i>Listeria innocua</i>	38	66	NP_47051	Glaser et al., 2001

なった (表 11)。以上の結果から、図 29 に示すように、*toxR*, *toxA*, *toxB*, *toxC* 遺伝子は、約 4 kb 以内に隣接して存在し、遺伝子の転写の向きが同方向であることから、この領域がトキソフラビン生合成遺伝子群であることが明らかになった。

2. トキソフラビン生合成遺伝子の転写と温度制御

トキソフラビンの生合成に関与する遺伝子、*toxR*, *toxA*, *toxB*, *toxC* が近傍に隣接し、*toxB*, *toxC* 遺伝子には、プロモーター配列が見あたらないことから、*toxR*, *toxA*, *toxB*, *toxC* 遺伝子が一つの転写単位で起きるものと考えられた。そこで、これら遺伝子が一つの単位で転写されているか否かを確認するため、mRNA について調べた。イネもみ枯細菌病菌から抽出した全 RNA を用いて、*toxC* 遺伝子上に設計された tb3 プライマーからの逆転写反応を行い、得られた cDNA を鋳型として、*toxR*, *toxA*, *toxC* 遺伝子を PCR 増幅することによってそれら遺伝子の転写を調べた。その結果、*toxA* および *toxC* 遺伝子については cDNA の増幅が見られたものの、*toxR* 遺伝子については増幅が見られなかった (図 30)。これらのことから、*toxA* 遺伝子と *toxC* 遺伝子の転写は、同一のプロモーターから開始されていることが示唆された。同時に、*toxB* 遺伝子は *toxA* と *toxC* 遺伝子の間に存在し、クラスターを形成していることから、*toxA*, *toxB*, *toxC* 遺伝子は同一転写単位であることが考えられた。一方、*toxR* 遺伝子は cDNA からの増幅が見られなかったことから、*toxR* 遺伝子は

表 11. *toxR* および *orf2* 遺伝子に相同性を示した遺伝子

微生物	各ゲノム上における遺伝子の位置(accession number)	
	<i>toxR</i> と相同性のある遺伝子	<i>orf2</i> と相同性のある遺伝子
<i>Ralstonia metallidurans</i>	comp. 34433~35344 (ZP_00025573)	35343~36008 (ZP_00025574)
<i>Pseudomonas putida</i>	4100123~4101052 (NP_745744)	comp. 4101053~4101583 (NP_745745)
<i>P. fluorescens</i>	17589~18581 (ZP_00084895)	comp. 17102~17737 (ZP_00084896)
<i>P. aeruginosa</i>	3723533~3724447 (NP_252010)	comp. 3722989~3723444 (NP_252011)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	5508~6608 (ZP_00007248)	comp. 5136~5978 (ZP_00007249)

comp. は相補鎖を示す

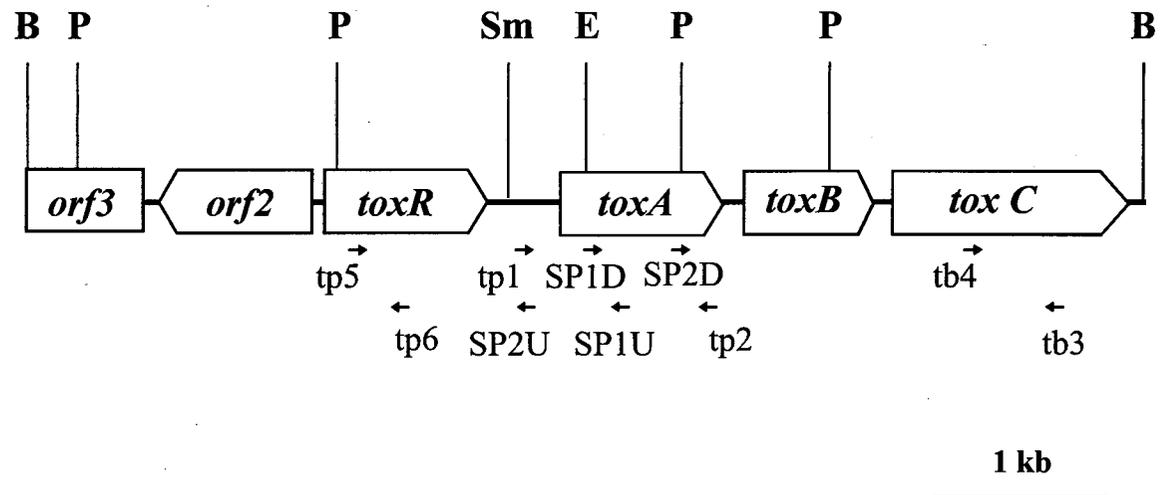


図29. トキソフラビン生合成遺伝子クラスターの概略図

四角の矢印はORFの方向、短い矢印はプライマーの方向

E: *EcoRI*, B: *BamHI*, P: *PstI*, Sm: *SmaI*

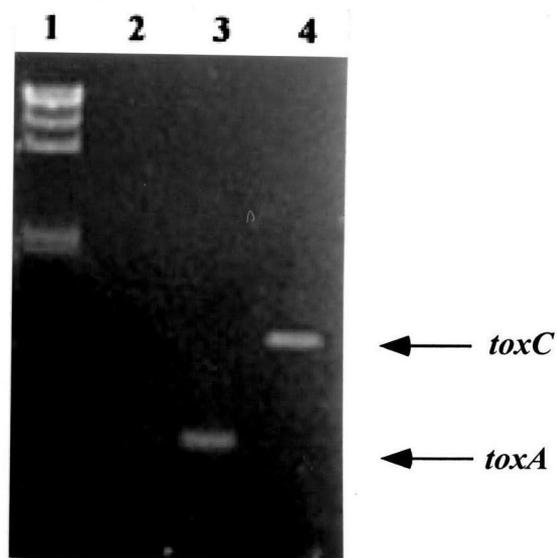


図30. RT-PCRによる*toxR*, *toxA*および*toxC*遺伝子の転写
*toxR*遺伝子増幅にはtp5およびtp6プライマー、*toxA*遺伝子増幅にはSP1DおよびSP1Uプライマー、*toxC*遺伝子増幅にはtb3およびtb4プライマーを用いた
 レーン1：マーカー
 レーン2：*toxR*遺伝子
 レーン3：*toxA*遺伝子
 レーン4：*toxC*遺伝子

toxA, B, C 遺伝子とは独立に転写される可能性が示唆された。

また、本菌の毒素非産生条件である 28 °C 培養条件下において、*toxR* および *toxA* 遺伝子の発現解析を行った。通常の 37 °C 培養では *toxR* および *toxA* 遺伝子共に発現が見られたが、28 °C 培養では両遺伝子共に発現が見られなかったことから、これらの遺伝子は何らかの温度制御を受けていることが示唆された。

3. トキソフラビン生合成とリボフラビン生合成との関係

トキソフラビン生合成は、ARPP までリボフラビン生合成と同一経路で進行し、GTP シクロハイドロラーゼ II をコードする *toxB* およびデアミナーゼをコードする *toxE* 遺伝子が関与すると考えられる。しかし、*toxA* および *toxC* 遺伝子はリボフラビン生合成には関与しないにも関わらず、*toxA* 遺伝子と *toxB* 遺伝子が同一単位で転写されることから、生体内に必要なリボフラビンの生合成を *toxB* 遺伝子のみが担っていることは考え難い。そのため、*toxB* 遺伝子とは別に、リボフラビン生合成に関わる *ribA* 遺伝子 (GTP シクロハイドロラーゼ II アイソザイム) が存在することが考えられた。そこで、イネもみ枯細菌病菌のゲノムを数種の制限酵素で切断し、*toxB* 遺伝子をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行い、*toxB* 遺伝子のホモログ遺伝子の存在を調べた。その結果、通常の 68 °C で洗浄した場合は、*toxB* 内部に存在する *PstI* DNA 断片以外では、1つのバンドが検出されたことから、*toxB* 遺

遺伝子が1コピーであることが明らかとなった(図 31-A)。しかし、48℃の低い温度で洗浄した場合には、上記バンドを含む複数のバンドが検出されたことから、*toxB* 遺伝子のホモログ遺伝子が存在するものと考えられた(図 31-B)。また、イネもみ枯細菌病菌 *toxB* 遺伝子は *E. coli ribA* 遺伝子と DNA 配列で 41.6%の相同性を有しており(図 32)、また部分的に相同性の高い部分が見受けられたため、*E. coli ribA* 遺伝子をプローブとして、低い洗浄温度のハイブリダイゼーションでイネもみ枯細菌病菌の *toxB* 遺伝子もしくは *ribA* 遺伝子の検出を行った。その結果、図 31-C に示すように、ポジティブバンドのパターンは、*toxB* 遺伝子ホモログと類似していたことから、*toxB* 遺伝子ホモログはイネもみ枯細菌病菌 *ribA* 遺伝子であることが推測された。これらのことから、トキソフラビン生合成経路における ARPP までの合成には、複数の遺伝子が関与するものと考えられた。

4. *toxR* 遺伝子破壊株の解析

toxR 遺伝子は、転写活性因子と高い相同性を有するため、この遺伝子がトキソフラビン生合成の制御に関与しているか否かを調べた。イネもみ枯細菌病菌野生株に *toxR* 遺伝子破壊用ベクター pMY411 を導入し、*toxR* 遺伝子中に Km 耐性遺伝子が導入されたと推定される Km 耐性株の3株を得た(図 33A)。これら3株について、ゲノム DNA を *EcoRI* および *PstI* で切断し、*toxR* 遺伝子の一部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、

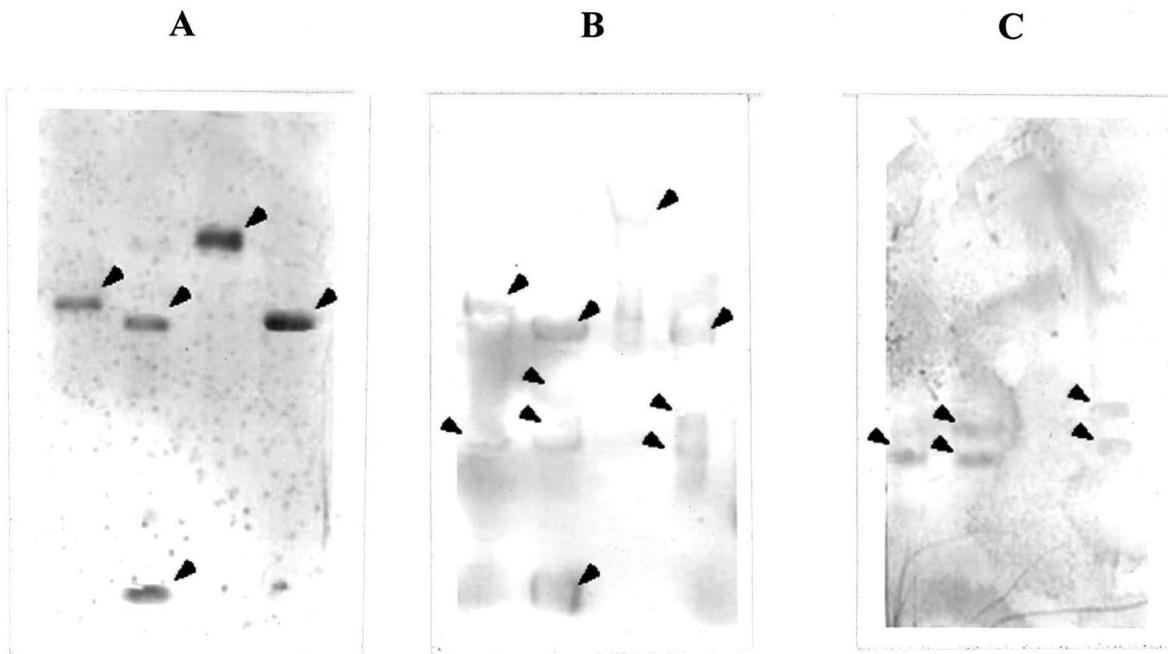


図31. イネもみ枯細菌病菌ゲノムDNAにおける*toxB*遺伝子ホモログの検出

レーン1: *EcoRI*切断

レーン2: *PstI*切断

レーン3: *HindIII*切断

レーン4: *SacI*切断

左向きの矢印は*toxB*のバンド、右向きの矢印は*toxB*ホモログのバンド

A: *toxB*をプローブとして、68°Cで洗浄した場合

B: *toxB*をプローブとして、48°Cで洗浄した場合

C: *E. coli ribA*をプローブとして、48°Cで洗浄した場合

		10	20	30	40	50
<i>B. glumae toxB</i>		GTG-----	-----	-----	-----	-----
<i>E. coli ribA</i>		ATGCAGCTTA	AACGTGTGGC	AGAAGCCAAA	CTGCCAACCC	CATGGGGCGA
		60	70	80	90	100
<i>B. glumae toxB</i>		-TTC-----	-----	-----GGC	AA-----	GATC-----
<i>E. coli ribA</i>		TTTCCTGATG	GTGGGATTTG	AAGAACTGGC	AACCGGACAC	GATCATGTCTG
		110	120	130	140	150
<i>B. glumae toxB</i>		-----	-GGCGA----	----GGCG--	--CCG---CT	GGTGCGCCTG
<i>E. coli ribA</i>		CGCTAGTCTA	TGGCGATATT	TCCGGGCATA	CCCCGGTACT	TGCGCGCGTC
		160	170	180	190	200
<i>B. glumae toxB</i>		CATTCCGAGT	GCCTGACGGG	CGACGTGTTT	GGCTCCGCGC	GCTGCGACTG
<i>E. coli ribA</i>		CATTCCGAAT	GTCTGACCGG	TGACGCCCTG	TTCAGCTTGC	GCTGCGATTG
		210	220	230	240	250
<i>B. glumae toxB</i>		CGGCAGCAG	CTCGACGAGT	CGATCGCGCT	GTTCCGGCGAG	CGCGGC---G
<i>E. coli ribA</i>		TGGCTTCCAG	CTCGAAGCGG	CATTGACGCA	AATTGCCGAG	GAAGGCCGTG
		260	270	280	290	300
<i>B. glumae toxB</i>		GCATCCTGCT	CTACCTGCGC	CAGGAAGGGC	GCGGCATCGG	GCTCTACAAC
<i>E. coli ribA</i>		GTATTTTGCT	GTATCACCGT	CAGGAAGGTC	GTAACATTGG	TCTGCTGAAT
		310	320	330	340	350
<i>B. glumae toxB</i>		AAGCTCGACG	CCTATCGCCT	GCAGATCTCG	CAGGGACTCG	ACACCTTCGC
<i>E. coli ribA</i>		AAAATCCGCG	CTTACGCACT	GCAGGAT---	CAAGGTTACG	ATACCCGTAGA
		360	370	380	390	400
<i>B. glumae toxB</i>		TGCCAATCGC	GCGCTCAACT	TCCCGGACGA	CCTGCGCGAC	TTC-CGCGTG
<i>E. coli ribA</i>		GGCTAACGAC	CAGTTAGGCT	TCGCGCGTGA	TGAGCGCGAC	TTGACTCTTT
		410	420	430	440	450
<i>B. glumae toxB</i>		GCGGCCCAGA	TGCTCAAGGC	GCTCGGCGTC	GGCGAGGTCT	CGCTGGTCAC
<i>E. coli ribA</i>		GCG-CTGATA	TGTTCAAAC	CCTTGGCGTC	AATGAAGTCC	GCTTGTTAAC
		460	470	480	490	500
<i>B. glumae toxB</i>		CAACAACCCC	GACAAGACCG	CGCAACTGAC	CCGTCACGGC	ATCAAGGTGC
<i>E. coli ribA</i>		CAATAACCCG	AAAAAAGTCG	AAATTCTGAC	CGAAGCAGGG	ATTAATAT-T
		510	520	530	540	550
<i>B. glumae toxB</i>		GCCAGGTGAA	GTCGACCGGC	-GTGTTCCGCC	AACAGCGTCA	ACTTTGGTTA
<i>E. coli ribA</i>		GTTGAACGCG	TACCATTGAT	TGTAGGTCGT	AACCCCAATA	ACGAACATTA
		560	570	580	590	600
<i>B. glumae toxB</i>		TCTGCATGEG	AAGGGGACCC	AGCACCGGCA	TGCCATCAAG	CTCAACGGAG
<i>E. coli ribA</i>		TCTCGATAAC	AAAGC---CG	AGAA--AATG	GGCCATTT-G	CTGAACA---
		610				
<i>B. glumae toxB</i>		AAATGCAATG	A.....			
<i>E. coli ribA</i>		-----AATA	A.....			

図32. イネもみ枯細菌病菌 *toxB* 遺伝子と大腸菌 *ribA* 遺伝子の相同性
網掛け部位は相同な塩基配列

3株全てにおいて破壊株として予想された長さのバンド (*EcoRI* 切断では 8.5 kb と 5.5 kb、*PstI* 切断では 3.7 kb と 3.0 kb) が検出された。これらのうちの1つを *toxR* 遺伝子破壊株 MY411 と命名し、以降の実験に用いた (図 33B)。

破壊株 MY411 は、King's B 液体培地で野生株と同様の成長速度を示し、その増殖能には影響を受けていないことが認められたので、本破壊株の病原性について調べた。イネ実生苗に対する病原性は、野生株が2週間程度で腐敗症状を示したのに対して、破壊株 MY411 では全く病徴を生じなかった (図 34)。また CaPG 寒天培地上における毒素産生能について調べたところ、野生株ではコロニーが蛍光黄色を示し、毒素産生の特徴を示したのに対して、破壊株 MY411 ではコロニーが白色を呈し、毒素を産生しないことが認められた。さらに、King's B 液体培地で培養した場合にも、破壊株 MY411 では HPLC の分析においてトキシフラビンのスポットが検出できなかった。これらのことから、破壊株 MY411 では増殖能には影響を受けないが、病原性および毒素産生能を欠損していることが明らかとなった。

さらに、毒素生合成遺伝子である *toxA* 遺伝子について、その mRNA の転写を RT-PCR により調べたところ、野生株では cDNA の増幅が見られたのに対して、破壊株 MY411 ではその増幅が起こらなかった (図 35)。つまり、*toxR* の破壊により *toxA* 遺伝子発現が抑制されることが認められた。

以上の結果から、*toxR* 遺伝子破壊株 MY411 では、*toxA* 遺伝子の転写抑制により、トキシフラビン産生が起こらないため、病原性が喪失したと考えられた。

A B C

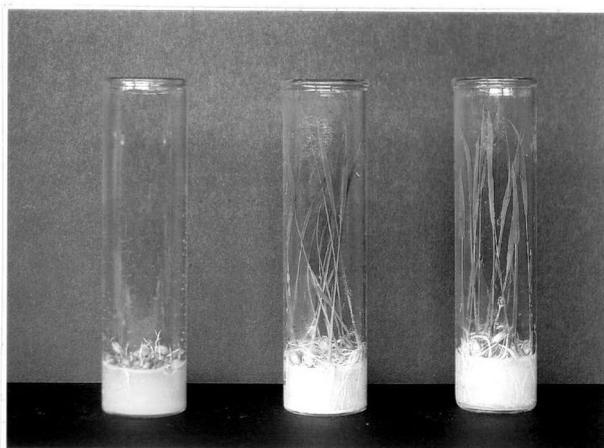


図34. *toxR*遺伝子破壊株MY411のイネ実生に対する病原性

A: 野生株、B: 破壊株MY411、C: 水処理

写真は接種14日後に撮影

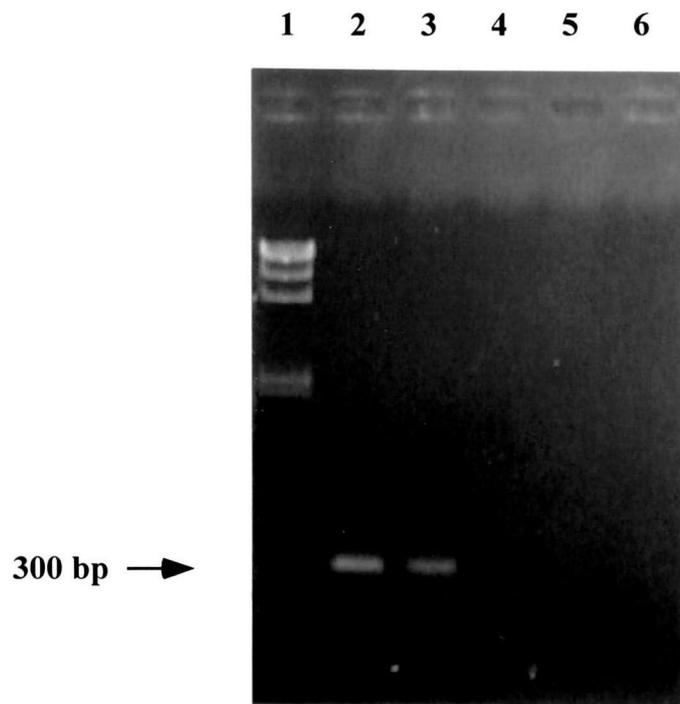


図35. *toxR*遺伝子破壊株MY411における*toxA*遺伝子の発現

レーン1: マーカー

レーン2: 野生株ゲノムDNA

レーン3: 野生株RNA

レーン4: 野生株RNA (逆転写酵素無し)

レーン5: MY411株RNA

レーン6: MY411株RNA (逆転写酵素無し)

5. *toxR* 遺伝子の転写活性因子としての役割

ToxR の属する LysR ファミリーは、制御する遺伝子の転写開始地点より-35 bp から-70 bp の T-N₁₁-A 配列に結合することが知られているが、*toxA* 遺伝子のプロモーター領域においても、二つの T-N₁₁-A 配列が存在した。そこで、この配列と *Pseudomonas. putida* の NahR の標的遺伝子 *nahA* (accession number: M11863)、*Azorhizobium* spp. の NodD の標的遺伝子 *nodA* (accession number: L18897)、*E. coli* の OxyR の標的遺伝子 *oxyS* (accession number: U87390)、*P. aeruginosa* の MexT の標的遺伝子 *mexE* (accession number: X99514) のそれぞれの T-N₁₁-A 配列について比較した。その結果、図 36 に示すように各 T-N₁₁-A 配列中に逆方向反復配列が見られ、*nahA* を除いて T-N₁₁-A-N₈-T-N₁₁-A モチーフの存在が認められた。さらに、*nahA*、*oxyS*、および *toxA* 遺伝子プロモーターの-35 配列を比較したところ、*nahA* および *oxyS* では二つ目の T-N₁₁-A モチーフに隣接したのに対して、*toxA* では一つ目の T-N₁₁-A モチーフに隣接していた。これらのことから、*toxA* の一つ目の T-N₁₁-A モチーフが ToxR タンパク質の結合部位となっていることが示唆された。

そこで、この領域へのタンパク質結合能をゲルシフト法により確認した。イネもみ枯細菌病菌の野生株を 37 °C の毒素産生条件と 28 °C の非産生条件下で培養した菌体、および *toxR* 遺伝子破壊株 MY411 の 37 °C 培養菌体から全タンパク質を抽出し、T-N₁₁-A 領域を含む標識 DNA 断片を用いてゲルシフト法を行った。その結果、図 37 に示すように、毒素産出時の野生株では、他の菌体におけるバンドとは異なる位置に新たなバンドが検出された。このバンドは、野生株を毒素非産生条件下で培養した菌体および破壊株 MY411

	1	**	**	*	*	58
<i>toxA</i>	TCGAAATGAATGGCGGCAATTCATTCAAAGAATTTCAAGGGTGC					AATTCACGTGGATA
<i>nahA</i>	ATTCGCAGTATTTCACGCTGGTGATAAACAAATTTCAACTATGCTTTATTGACAAATAAA					-27
<i>nodA</i>	GATTGTGCCATCGATCACGTGGATTGGCTGTATTCGGTAATTGGAATTGACCGGTAGA					-20
<i>oxyS</i>	ATCGCCACGATAGTTCATGGCGATAGGTAGAATTAGCAATGAACGATTATCCCTATCAA					-27
<i>mexE</i>	AAACCATGTATCACTGTTTCGTGATAATCAAATCTCGTCGTTCGATTAGTTCCTGCC					

図36. LysRファミリータンパク質の推定結合領域

toxA : イネもみ枯細菌病菌*toxA*遺伝子の開始コドンから199 bp上流の配列

nahA : *P. putida nahA*遺伝子の開始コドンから50 bp上流の配列

nodA : *Azorhizobium* spp. の*nodA*遺伝子の開始コドンから91 bp上流の配列

oxyS : 大腸菌の*oxyS*転写開始点より27 bp上流の配列

mexE : *P. aeruginosa*の*mexE*遺伝子の開始コドンから56 bp上流の配列

*はT-N₁₁-Aモチーフ、二重線はそれぞれの遺伝子のプロモーター-35配列

矢印はT-N₁₁-A内に見出された逆方向反復配列

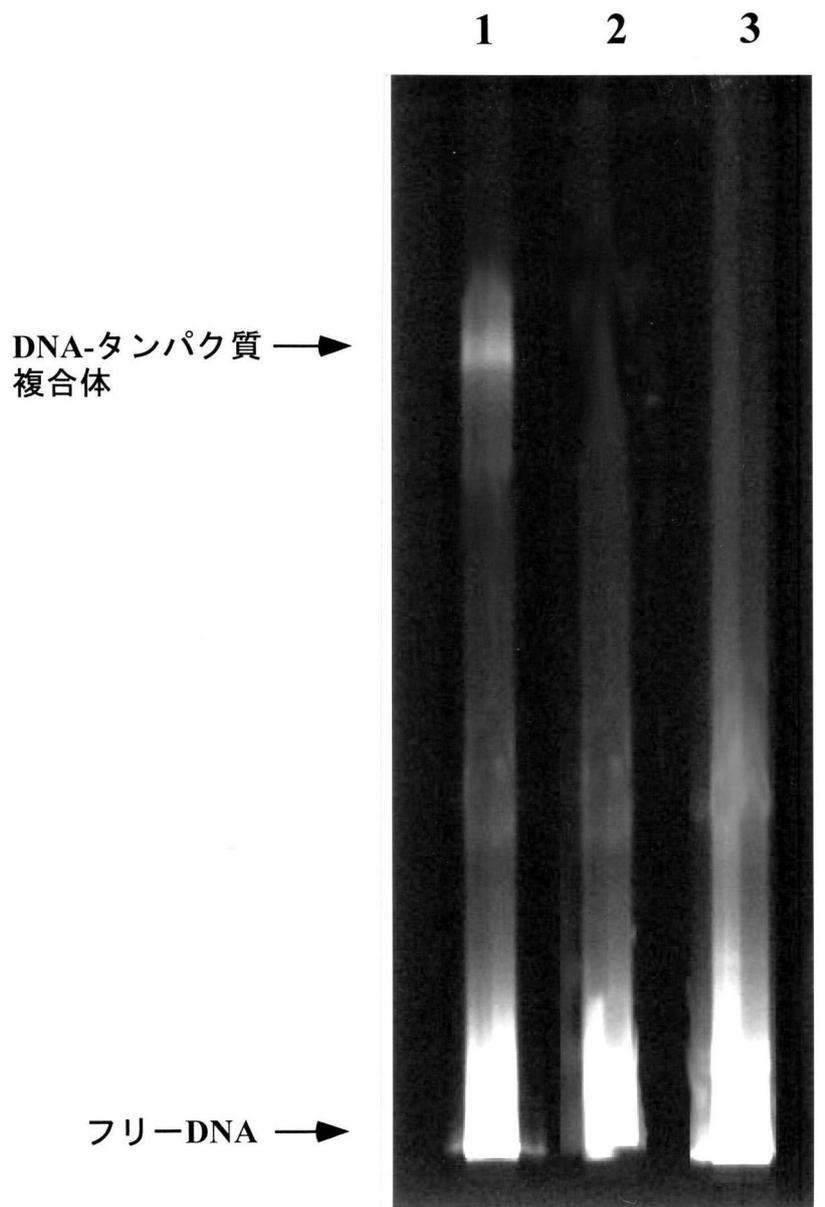


図37. ゲルシフト法によるDNA-タンパク質複合体の検出

レーン1: 野生株

レーン2: 野生株 (28 °C)

レーン3: *toxR*遺伝子破壊株MY411株

の菌体では検出されないことから、タンパク質-DNA 複合体であると推測された。

考察

本章の研究では、トキソフラビン生合成遺伝子として既知の *toxA* 遺伝子下流に *toxB* および *toxC* という二つの生合成遺伝子が存在することが確認された。これら3種の遺伝子は非常に近傍に位置しており、一つの転写単位であったことから、クラスターを成していることが明らかとなった。毒素生合成遺伝子がこのようなクラスターを成すことは他の細菌においても多くの報告がある。細菌にとって、毒素産生のような目的の場合には、遺伝子がクラスターを形成することが毒素生合成を制御する上で容易であるという利点がある。

トキソフラビン生合成については、これまでの研究により、トキソフラビンのアゾプテリジン環のピリミド部位はプリンに由来し、トリアジン部位はグリシンのアミノメチル基から、また N-メチル基はメチオニンに由来することが明らかとなっており、このことからリボフラビン生合成と同様のステップを経ると考えられている (Richter et al., 1993; Levenberg and Sander, 1966; 福島, 1975; Bacher et al., 1996; Richter et al., 1997)。本研究で単離された生合成遺伝子の *toxB* 遺伝子は、リボフラビン生合成酵素の一つである GTP シクロヒドロラーゼ II と顕著な相同性を示した。また、*toxA* はメチルトランスフェラーゼをコードすることから考えて、GTP シクロヒドロラーゼ II によって GTP の開環が起こり、グリシンが抱合し、メチオニンからメチルトランスフェラーゼによってメチル基が付加され、トキソフラビンが合成されると考えられる。*toxC* 遺伝子については、機能未知であるが、そのアミノ酸配列に W-D リピート領域が見出された。この W-D リピート領域は、原核生物のシアノバクテリアに属する、わず

か3菌だけにしか見出されないことから、大変興味深い事実である。通常 W-D リピート構造をとるタンパク質は真核生物で多くの報告があり、細胞分裂や遺伝子の転写、細胞膜上でのシグナル伝達に関連していることが知られている (Garcia-Higuera et al., 1996)。その中に GTP 結合タンパク質の β サブユニットが W-D リピート構造を形成しているという報告がある (Fong et al., 1986; Neer et al., 1994; Sondek et al., 1996)。それ故、*toxC* 遺伝子はトキソフラビン生合成において非酵素的に働き、GTP への結合に関与している可能性が考えられる。

トキソフラビン生合成の最初のステップである GTP 開架反応は、リボフラビン生合成と同一酵素反応で起こると考えられるが、この反応がトキソフラビン生合成の *toxB* 遺伝子のコードする酵素で行われているのか、リボフラビン生合成の GTP シクロヒドロラーゼ II も関与しているのかは非常に重要なことである。トキソフラビン生合成酵素を薬剤ターゲットして考えた場合、もし GTP 開架反応が両酵素で進むと仮定すると、ToxB 酵素の反応を薬剤で抑えても、リボフラビン生合成の GTP シクロヒドロラーゼ II が存在すればトキソフラビンの合成は起こることになる。リボフラビンは生物体にとって必要な物質であり、微生物は自身で合成できることが知られている (Bacher et al., 1996)。細菌のリボフラビン生合成遺伝子群は、*ribA* 遺伝子を含むクラスターを形成しており (Richter et al., 1993)、*toxB* 遺伝子の場合もトキソフラビン生合成遺伝子のクラスター内に存在し、しかもリボフラビン生合成に関与しない *toxA* 遺伝子と同一転写単位で発現される。従って、*toxB* 遺伝子産物のみが GTP の開架反応を行っていることは考え難い。そのため、イネもみ枯細菌病菌のリボフラビン生合成遺伝子 *ribA* の存在を調べることにした。一般に、グラム陰性菌は *ribA* 遺伝子

を、グラム陽性菌は次のステップの脱アミノ反応活性を同時に有する *ribAB* 遺伝子をもつことが知られている (Fassbinder et al., 2000)。そこで、グラム陰性菌でイネもみ枯細菌病菌 *toxB* 遺伝子と DNA 配列にて約 40%の相同性をもつ大腸菌 *ribA* 遺伝子 DNA をプローブとして、穏和な条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、*toxB* 遺伝子 DNA をプローブとした場合と同一のパターンを示した。この両プローブに対するポジティブ DNA が、イネもみ枯細菌病菌の *ribA* 遺伝子 DNA である可能性が示唆された。現在まで、イネもみ枯細菌病菌の *ribA* 遺伝子およびその他のリボフラビン生合成遺伝子の単離には至っていないが、GTP 開架反応には、トキソフラビンおよびリボフラビン生合成の両酵素が関与していると考えられる。

トキソフラビン生合成遺伝子クラスターの上流には、LysR ファミリーに相同性の高い *toxR* 遺伝子が見出された。転写活性因子として報告のある LysR タンパク質の中では、*P. putida* の MexT (Kohler et al., 1999)、*S. paucimobilis* の LinR (Miyuchi et al., 2000) 等が比較的相同性が高かった。また、約 15%の相同性を示した NodD (Goethals et al., 1992)、NahR (Schell, 1986) においても、N 末端では相同性が高く、特にヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフが存在する N 末端 70 残基においては、約 40%の相同性を示した。LysR タンパク質は約 300 アミノ酸からなる細菌の代表的な転写活性因子であり、標的遺伝子のプロモーター近傍へ結合して mRNA ポリメラーゼの活性を補助すると考えられている (Schell, 1993; Henikoff et al., 1988)。*toxR* 遺伝子を破壊した MY411 株では毒素産生能を失っており、また *toxA* 遺伝子の発現が抑えられていたことから、*toxR* 遺伝子の毒素生合成遺伝子への関与が認められた。さらに、*toxA* 遺伝子プ

ロモーターのすぐ上流には LysR タンパク質のターゲット配列である T-N₁₁-A モチーフが見出された。通常、LysR タンパク質は二量体となって T-N₁₁-A モチーフへ結合するが、*E. coli* の OxyR (Michael et al., 1989) では隣接する 2 つの T-N₁₁-A 配列 (Gonzalez-Flecha and Demple, 1999) へ四量体を形成して結合するものと考えられている (Zheng et al., 1998; Zaim and Kierzek, 2003)。*Rhizobium* sp. の NodD においても、結合モチーフである Nod ボックスは NYATCCAYNNYRYRGATGNNNNYNATCNAACAATCGATTTTA (下線部が T-N₁₁-A 配列) からなり、やはり四量体で結合する (Zheng et al., 1998; Goethals et al., 1992)。*toxA* プロモーターにおいても二つの T-N₁₁-A 配列が存在したが、片方の T-N₁₁-A 配列はプロモーターの -35 配列と重なっているため実際には働かない可能性が高いと思われる。もう一つの T-N₁₁-A を含む配列には、LysR ファミリーにおいても多数報告がある 6 塩基のパリンドローム構造を有し (Schell, 1993; Michel, 1994; Dhandayuthapani et al., 1997)、この部位への ToxR タンパク質の結合が考えられる。これは、毒素産生時のタンパク質においてのみ結合性が認められたこと、また *toxR* 遺伝子が破壊された MY411 株では結合性が無かったことなどから、ToxR タンパク質がこの領域に結合し、転写の活性化を行っていることが考えられる。

LysR タンパク質の多くは、標的遺伝子と逆向きに隣接して、そのターゲット配列 T-N₁₁-A を重複することで、自身の転写も同時に活性化する自動制御機構を備えている (Schell, 1986)。イネもみ枯細菌病菌の *toxR* 遺伝子は *toxA* 遺伝子と転写方向が同一であり、*toxR* 遺伝子上流には T-N₁₁-A 配列が存在しないことから、*P. putida* の MexT (Kohler et al., 1999; Poole, 2001) と同様に、自動制御機

構をもっていないと考えられる。また近年、LysR タンパク質の活性化および誘導機構が明らかになりつつある。例えば、活性酸素の除去遺伝子を活性化させる *E. coli* の OxyR は通常還元型であり、除去遺伝子のプロモーター近傍へ結合しているが、細胞内の活性酸素濃度の上昇によって酸化型に変化し、RNA ポリメラーゼのプロモーター領域への結合を促進する (Michel et al., 1994; Kullik et al., 1995)。 *Rhizobium* sp. の NodD の結合性は、植物由来のフェノール性化合物によって促進されることが知られている (McIver et al., 1989)。また、LysR ファミリーの中で、唯一病原性に関与する *Ralstonia solanacearum* の *phcA* は、自身の細胞外成分の脂肪酸によって誘導される Two-component system を通して *phcA* を誘導し、その PhcA タンパク質が *xpsR* を誘導し、最終的に病原性に関与する細胞外多糖合成遺伝子を誘導する (Huang et al., 1995; Flavier et al., 1997; Huang et al., 1998)。イネもみ枯細菌病菌では、このようなシグナル物質や制御系は見つかっていないが、28℃培養条件下では *toxR* 遺伝子の発現が見られなかったことから、何らかの温度制御因子が *toxR* 遺伝子の発現を制御していることが考えられる。

本研究では、ToxR タンパク質の大量発現を大腸菌で試みたが、封入体を形成してしまっただけで、精製には至らなかった。しかし、他の LysR タンパク質である *Ralstonia eutropha* の *fdsR* や *P. putida* の *salR* のように大腸菌での大量発現に成功した例 (Oh and Bowien, 1999; Sato et al., 2001)、 *Micobacterium leprae* の OxyR のように封入体からリフォールディングを成功させた例 (Dhandayuthapani et al., 1997) から見て、最適なベクターあるいはカラム精製条件によっては解決される可能性もあると考えられる。

なお、*toxR* 遺伝子上流に見出された *orf2* は機能未知のタンパク質と相同性を示したが、トキシフラビン産出との関連性は不明である。ただし、*orf2* 遺伝子と相同性の高い5つの細菌の遺伝子が、*toxR* と相同性の高い遺伝子に隣接して存在することは興味深い事実である。

総合考察

イネもみ枯細菌病菌によって引き起こされるイネ苗腐敗症は、主に箱育苗においてその伝染が拡大するため、一度発生すると大きな被害をもたらす。また本病の農薬による防除は、細菌の増殖が早いため、あまり効果が上がらないうえ、耐性菌の出現も招きかねない。本病原菌については、その病原性が非常に不安定であることからあまり研究が進んでおらず、その伝染環や感染様式など不明な点が多い。

イネもみ枯細菌病菌の病原性因子を解明するために作出された病原性欠損変異株 No. 19 では、*bgp1* 遺伝子の下流に本来存在するはずの IS1417 が欠落しており、代わりにその部位にトランスポゾン Tn4431 が挿入されていることが確認された。変異株 No. 19 は、ゲノム DNA 中に 1 コピーの Tn4431 を有すること、IS1417 とその周辺遺伝子を含む野生株ゲノム断片によって毒素産生能が相補されること、および IS1417 復帰株 No. 19R において毒素産生能が回復したことなどから、Tn4431 による変異は、IS1417 を含む相補断片内においてのみ起こっているものと考えられる。さらに、これらのことは IS1417 が毒素産生能に関与していることを強く示唆している。IS 因子などの可動遺伝子が病原性に関与する報告例はあまり知られていないが、以前より、本菌の病原性は非常に不安定であることが知られており、実際に本菌を数回継代しただけで、容易に病原性を失活した変異株が得られることから、この不安定さの要因が、IS1417 に起因していると考えられる。

変異株 No. 19 においては、*bgp1* 遺伝子の発現が抑制されていたことから、

bgp1 遺伝子発現と IS1417 に関係があると考えられる。IS1417 と *bgp1* 遺伝子は、約 500bp のスペーサーを挟み向き合って存在しており、また IS1417 のトランスポザーゼ遺伝子は *bgp1* 遺伝子発現に関係しなかった。これらのことから、IS1417 が *bgp1* 遺伝子のターミネーターの様な働きを行い、制御していることが考えられる。確かに、IS1417 上には、ターミネーター様配列が見られたが、この配列が実際に機能しているか否かは分からなかった。

bgp1 遺伝子破壊株 MY403 においては、変異株 No. 19 と同様の性質を示したことから、変異株 No. 19 の毒素非産生能は *bgp1* 遺伝子抑制と関係していることが確認された。また、変異株 No. 19 および破壊株 MY403 はトキシソフラビンに感受性であることから、*bgp1* 遺伝子がトキシソフラビンの耐性機構に関連していると考えられる。これらのことから、トキシソフラビンの生合成と耐性機構が密接に連動していることが推測される。

一方、トキシソフラビン生合成遺伝子の解明では、生合成遺伝子 *toxA*, *toxB*, *toxC* および制御遺伝子 *toxR* について解析を行い、*toxA*, *toxB* および *toxC* がクラスターを成し、ポリシストロニックに転写されることが明らかとなった。通常、病原性に関わる遺伝子の多くは、クラスターを形成していることが多い。これはその病原菌において、病原性を制御しやすいためであると考えられる。また、植物病原菌の進化の過程上、病原性を獲得する場合に、遺伝子が集約している方が有利であることが考えられる。本菌においては、リボフラビン生合成遺伝子と共通しているのは、*toxB* および *toxE* 遺伝子であるが、その間にシアノバクテリアにのみ相同性ある *toxC* 遺伝子が存在することは興味深い。また、*toxR* と *orf2* は他の菌においても近隣に位置しているものの、

それぞれのゲノムにおいて、リボフラビン生合成遺伝子とは離れた位置に存在している。これらのことから、トキソフラビン生合成クラスターは独自に進化してきたことが考えられる。

それぞれの遺伝子相同性から、トキソフラビン生合成経路が推測され、途中まではリボフラビン生合成と同一の経路を経ることが考えられた。また、生合成開始反応である GTP 開架を担う *toxB* 遺伝子については、ホモログ遺伝子の存在が示唆されたため、リボフラビンと分岐するまでは、複数の酵素によって進行することが考えられる。

また、トキソフラビン生合成の制御遺伝子 *toxR* は、転写活性因子である LysR ファミリーと相同性の高い遺伝子を見出した。*toxR* 遺伝子の破壊株 MY411 では、野生株と比べて、生育上の変化は認められなかったものの、トキソフラビン産生能および病原性が失われた。さらに、破壊株 MY411 では、*toxA* 遺伝子の発現が抑制されていたことから、*toxR* 遺伝子が *toxA* 遺伝子の活性化に関与することが考えられた。また、LysR ファミリーの標的 DNA である T-N₁₁-A 配列が、クラスターの最上流に位置する *toxA* 遺伝子プロモーター上に存在したこと、クラスター遺伝子はポリシストロニックに転写されることを考えると、*toxR* 遺伝子がトキソフラビン生合成全体の制御を支配していることが推測される。同時に、本菌の病原性において、*toxR* が必須の制御遺伝子であると考えられる。これらのことから、ToxR タンパク質は本菌の防除薬剤のターゲットとして最適であるといえる。

LysR ファミリータンパク質は、原核生物において主要な転写活性因子であるものの、これまで植物病原菌の病原性と関与が知られているのは、*Ralstonia*

solanacearum の *phcA* 遺伝子のみである。この *phcA* 遺伝子は、自身の二次代謝産物を認識する Two-component system によって制御されていることが明らかとなっているが (Flavier et al., 1997)、イネもみ枯細菌病菌においては、このような機構はまだ知られていない。いくつかの LysR ファミリーにも、自身を活性化させるシグナル物質の存在が知られていることから、本菌においても、*toxR* 遺伝子を直接的、あるいは間接的に制御する因子が存在することが考えられる。

植物病原毒素のいくつかは、温度によって制御されることが知られている。例えば、*P. syringae* pv. *phaseolicola* の毒素ファゼオロトキシン (Jackson, et al., 1999)、および *P. syringae* pv. *atropurpurea* の毒素コロナチンは、16 °C の低温でのみ産出される (Bender et al., 1999b)。これらの詳細なメカニズムは、まだ明らかとされていないが、その菌において、16 °C 前後の季節に病原性を発揮することが有利になるためだと考えられている。イネもみ枯細菌病菌においては、32 °C から 37 °C の温度でのみトキシフラビンが産生されることから、上記の毒素ほど厳密ではないが、なんらかの温度制御機構が存在していると考えられる。実際に、28 °C の培養条件下においては、*toxR* 遺伝子の発現が見られなかったことから、この *toxR* 遺伝子の制御遺伝子が、温度の認識機構と関連していることが考えられる。本菌における *toxR* 遺伝子発現に達するまでの経路は、まだ不明であるが、今後ゲノム解析等により明らかにされることが期待される。

要旨

イネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae* は、わが国におけるイネの重要病害であるイネもみ枯細菌病を引き起こす病原細菌である。本病原細菌は、1976年にイネのもみを蒼白色に枯死させる原因菌として初めて同定された。その後、本病原細菌がイネにおける苗腐敗症に関係していることが明らかとなり、イネの苗腐敗症およびもみ枯症の原因細菌として注目されるようになった。イネもみ枯細菌病は全国的に発生するが、とくにイネ苗腐敗症は近年の機械化移植にともなう箱育苗において多発し、大きな問題となっている。また、本病原細菌の病原性に関しては、病原性欠損変異株およびその回復株の研究により、本菌の産生する毒素トキシフラビンが病徴の発現と深く関与していることが明らかになっている。また、トキシフラビン生合成については数種類の生合成遺伝子が単離・同定されているが、これらの具体的な機能および制御機構については明らかになっていない。

そこで、本研究ではイネもみ枯細菌病菌の病原性を解明することを目的として、第1章ではトランスポゾン導入による病原性欠損変異株、およびその病原性欠損変異株への野生株ゲノムライブラリーの導入による病原性回復株を用いた病原性関連遺伝子の解析、第2章では毒素トキシフラビン生合成系に関与する遺伝子およびその制御機構の解析を行った。

第 I 章 イネもみ枯細菌病菌の病原性欠損変異株の作出と解析

イネもみ枯細菌病菌へトランスポゾン Tn4431 を導入・作出した病原性および毒素産生能の欠損変異株 No. 19 (病原性欠損変異株 No. 19 と呼ぶ)、およびこの変異株 No. 19 の病原性を回復した野生株ゲノムライブラリーのコスミド pNP147 について解析を行った。

病原性欠損変異株 No. 19 におけるトランスポゾン挿入部位のゲノム解析では、まずトランスポゾンを探プローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより Tn4431 を含むゲノム DNA 断片を取得し、次いでこの DNA 断片を探プローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、コスミド pNP147 中の約 25 kb DNA 挿入断片についてサブクローニングを行い、ポジティブバンドを示した約 2.6 kb DNA 断片を得た。この DNA 断片の塩基配列の決定により、両末端に逆方向反復配列および内部にトランスポザゼ遺伝子を有する転移因子 IS1417 が存在することが明らかになった。

次いで、病原性欠損変異株 No. 19 における Tn4431 挿入部位周辺の DNA 解析およびコスミド pNP147 の約 25 kb 挿入断片について解析し、病原性欠損変異株 No. 19 では Tn4431 挿入領域に、および pNP147 の約 25 kb 挿入断片では IS1417 下流に、それぞれ機能未知の *bgp1* 遺伝子が存在することが明らかになった。さらに、病原性欠損変異株 No. 19 では本来挿入されているはずの IS1417 が欠落し、その位置より 78 bp 上流に Tn4431 が存在すること、また野生株ゲノムの IS1417 を探プローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、イネもみ枯細菌病菌に存在する約 8 コピーの IS1417 の中で、*bgp1*

遺伝子に隣接する IS1417 のみが病原性欠損変異株 No. 19 で欠落していることが明らかになった。これらの結果から、病原性欠損変異株 No. 19 では Tn4431 が *bgp1* 遺伝子下流へ挿入された際に IS1417 が他の場所へ排除されたものと考えられた。しかし、転移因子 IS1417 が直接病原性遺伝子の発現と関係していることは考え難いので、隣接する *bgp1* 遺伝子の発現について調べたところ、野生株では *bgp1* 遺伝子の転写が認められたのに対し、病原性欠損変異株 No. 19 ではその転写が認められなかったことから、*bgp1* 遺伝子の発現には、IS1417 が何らかの関与をしているが明らかになった。

変異株 No. 19 のトランスポゾン Tn4431 を除去した毒素産生能復帰株 No. 19R のゲノム解析では、Tn4431 が欠落し、その位置へ再度 IS1417 が挿入されていたことから、*bgp1* 遺伝子の発現が復帰されたものと考えられた。また、*bgp1* 遺伝子破壊株 MY403 では毒素産生能を欠失し、病原性欠損変異株 No. 19 と同様の性質を示したことから、毒素産生には IS1417 の存在による *bgp1* 遺伝子の発現が必須であることが明らかになった。一方、IS1417 トランスポザーゼ遺伝子破壊株 MY402 では毒素産生能が影響を受けなかったことから、*bgp1* 遺伝子の発現には IS1417 の存在が必須であるが、IS1417 に内在するトランスポザーゼ遺伝子自体はその発現に関与しないことが明らかになった。従って、IS1417 の有する何らかの塩基配列あるいは立体構造が *bgp1* 遺伝子の発現に重要であると考えられた。

さらに、病原性欠損変異株 No. 19 ならびに *bgp1* 遺伝子破壊株 MY403 のトキシソフラビン耐性試験では、両変異株ともにトキシソフラビンに感受性を示し

たことから、*bgp1* 遺伝子がトキシフラビンの耐性機構に関与することが明らかになった。すなわち、病原性欠損変異株 No. 19 および *bgp1* 遺伝子破壊株 MY403 では *bgp1* 遺伝子が関与する毒素耐性機構とトキシフラビン生合成機構が密接に連動しているため、毒素産生が阻害されるものと考えられた。

以上の結果から、イネもみ枯細菌病菌の毒素トキシフラビンの産生には、毒素耐性に関与する *bgp1* 遺伝子の発現が必須であり、この *bgp1* 遺伝子の発現にはその下流に存在する転移因子 IS1417 の有する特異的塩基配列が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、このような転移因子による病原性の制御が本病原細菌の病原性における不安定要因の一つであるとも考えられる。なお、植物病原菌において病原性が転移因子により正の制御を受けている例はほとんど見出されておらず、学問的には大変興味深い事実であるといえる。

第 II 章 トキシフラビン生合成遺伝子系の解析

トキシフラビン生合成遺伝子に関しては、メチル基転移酵素をコードする *toxA* 遺伝子、GTP シクロヒドロラーゼ II をコードする *toxB* 遺伝子、W-D リピート配列を有する *toxC* 遺伝子、およびデアミナーゼをコードする *toxE* 遺伝子が遺伝子クラスターとして存在することが示唆されている。しかし、これら生合成遺伝子の発現制御については全く明らかにされていない。この

ことから、トキソフラビン生合成遺伝子の制御機構を解明することを目的に研究を行った。

まず、*toxA* 遺伝子の周辺 DNA 領域を取得し、制御遺伝子の探索および、生合成遺伝子の解析を行った。その結果、*toxA* 遺伝子の下流約 2 kb 以内には *toxA* 遺伝子と同方向に *toxB* 遺伝子および *toxC* 遺伝子が存在することが認められた。一方、*toxA* 遺伝子上流には新規の遺伝子 (*toxR* と命名) が存在することが発見された。これら遺伝子の転写を RT-PCR により調べたところ、*toxR* を除いて *toxA*、*toxB* および *toxC* 遺伝子は同一の mRNA として転写されることが明らかとなった。また、*toxB* および *toxC* 遺伝子にはプロモーター配列が存在しないことから、これら遺伝子は *toxA* 遺伝子プロモーターから転写されるものと考えられた。

次いで、*toxA* 遺伝子上流に新たに発見された *toxR* 遺伝子のデータベース解析から、転写活性化因子である LysR ファミリータンパク質と高い相同性を有し、その推定アミノ酸配列の N 末端には DNA 結合モチーフであるヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフが存在することが明らかになった。また、*toxR* 遺伝子がトキソフラビン生合成に関与するか否かについて、相同組換え法により *toxR* 遺伝子破壊株 MY411 を作出して調べたところ、破壊株 MY411 では病原性およびトキソフラビン産生能の欠失とともに、*toxA* 遺伝子の発現が抑えられていることが認められた。つまり、*toxR* 遺伝子はトキソフラビン生合成遺伝子群の発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

さらに、*toxA* 遺伝子プロモーター領域の DNA 解析により、この領域が他の LysR ファミリーの標的領域と高い相同性を示すとともに、LysR ファミリータンパク質の標的 DNA 配列となる T-N₁₁-A 配列が存在することが明らかになった。そこで、この T-N₁₁-A モチーフを含む DNA 領域へのタンパク質結合能をゲルシフト法により調べた結果、菌体からの抽出タンパク質中の ToxR タンパク質-DNA 複合体と推測されるポジティブバンドは、毒素産生条件における野生株では検出されたが、毒素非産生条件の野生株ならびに *toxR* 遺伝子破壊株 MY411 では検出されなかった。したがって、*toxR* 遺伝子は *toxA* 遺伝子の発現・制御に関係するだけでなく、トキソフラビン生合成遺伝子のクラスター全体を調節する制御遺伝子であると考えられた。

なお、トキソフラビン生合成系はリボフラビン生合成系と同様に、GTP から *toxB* 遺伝子のコードする GTP シクロヒドロラーゼ II による開環反応、*toxE* のコードするデアミナーゼ反応を経由して合成され、その後リボフラビン生合成系から分岐してグリシンの抱合、*toxA* のコードするメチルトランスフェラーゼによりメチオニンからのメチル基転移が起こり、トキソフラビンが合成されると考えられている。しかし、リボフラビンは生体内における必須の物質であり、トキソフラビン生合成遺伝子群である *toxB* 遺伝子がリボフラビン合成における GTP の開環反応を同時に担っているとは考え難い。そこで *toxB* 遺伝子および大腸菌におけるリボフラビン生合成系の GTP シクロヒドロラーゼ II をコードする *ribA* 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、これら遺伝子のホモログについて調べた。その結果、

両プローブによるポジティブバンドは全く同一のパターンを示したことから、GTP シクロハイドロラーゼ II のアイソザイムが存在することが示唆された。このことから、トキソフラビン合成系とリボフラビン合成系における共通経路はおそらく別々の酵素によって反応が進行するものと考えられた。

以上の結果から、イネもみ枯細菌病菌におけるトキソフラビン生合成はメチル基転移酵素をコードする *toxA* 遺伝子、GTP シクロハイドロラーゼ II をコードする *toxB* 遺伝子、W-D リピート配列を有する *toxC* 遺伝子、およびデアミナーゼする *toxE* 遺伝子が遺伝子クラスターとして存在し、これら遺伝子の発現は *toxR* 遺伝子のコードする LysR ファミリータンパク質によって正の制御を受けていることが明らかになった。また、トキソフラビン生合成系の初期段階は GTP から出発するリボフラビン生合成系と共通の過程で進行するが、最初の GTP シクロハイドロラーゼ II 遺伝子には複数のホモログが存在することから、両合成系は異なる酵素群によって進行することが明らかになった。

最後に、本研究によりイネもみ枯細菌病菌の病原性発現には毒素トキソフラビンの産生が必須であり、その産生には転移因子 IS1417 の存在による毒素耐性遺伝子 *bgp1* の発現が必須であること、さらに毒素生合成遺伝子の発現・制御には *toxR* 遺伝子が関与することを明らかにした。なお、*toxR* 遺伝子破壊株では全く病原性を示さなかったことから、*toxR* 遺伝子のコードする LysR ファミリータンパク質がイネもみ枯細菌病を防除する上で最適なターゲット

として今後利用されることが期待される。

参考文献

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 : 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

畔上耕児. (1985). 苗箱におけるイネ苗立枯れと病原細菌. *植物防疫* 39: 416-419.

Azegami, K., Nishiyama, K. and Kato, H. (1988). Effect of iron limitation on *Pseudomonas plantarii* growth and tropolone and protein production. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 844-847.

Bacher, A., Eberhardt, S. and Richter, G. (1996). Biosynthesis of riboflavin. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology (Neidhart, F. C., Ed.), pp. 657-664. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Palm, C., Peck, M. C., Surzycki, R., Wells, D. H., Yeh, K.-C., Davis, R. W., Federspiel, N. A. and Long, S. R. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 9883-9888.

Barsomian, G. and Lessie, G. T. (1987). IS2 Activates the *ilvA* gene of *Pseudomonas cepacia* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169: 1777-1779.

Bender, C. L., Malvick, D. K. and Mitchell, R. E. (1989). Plasmid-mediated production of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. J. Bacteriol. 171: 807-12

Bender, C. L., Chaidez, F. A. and Gross, D. C. (1999a). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 266-292.

Bender, C. L., Rangaswamy, V. and Loper, J. (1999b). Polyketide production by plant-associated *Pseudomonads*. Annu. Rev. Phytopathol. 37:175-196.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. and Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 417 :141-147

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Comai, L., and Kosuge, T. (1983). Transposable element that cause mutations in a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* 154 : 1162-1167.

Dhandayuthapani, S., Mudd, M. and Deretic, V. (1997). Interaction of OxyR with the promoter region of the *oxyR* and *ahpC* genes from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 179: 2401-2409

Duque, E., Segura, A., Mosqueda, G. and Ramos, J. L. (2001). Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* 39: 1100-1106.

Farabaugh, P. J. (1996). Programmed translational frameshifting. *Microbiol. Rev.* 60 : 103-134.

Fassbinder, F., Kist, M. and Bereswill, S. (2000). Structural and functional analysis of the riboflavin synthesis genes encoding GTP cyclohydrolase II (*ribA*), DHBP synthase (*ribBA*), riboflavin synthase (*ribC*), and riboflavin deaminase/reductase (*ribD*) from *Helicobacter pylori* strain P1. *FEMES Microbiol. Lett.* 191: 191-197.

Flavier, A. B., Ganova-raeva, L. M., Schell, M. A. and Denny, T. P. (1997). Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: Control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system

responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *J. Bacteriol.* 179: 7089-7097.

Fong, H. K., Hurley, J. B., Hopkins, R. S., Miake-Lye, R., Johnson, M. S., Doolittle, R. F. and Simon, M. I. (1986). Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2162-2166

藤井溥・植松勉 (1976). イネ育苗箱に発生するもみ枯細菌病菌による苗腐敗症. *植物防疫* 30 : 13-16.

福島健 (1975). プテリン化合物の生合成. *蛋白質・核酸・酵素* 20: 691-699.

Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C. and Batut, J. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.

Garcia-Higuera, I., Fenogo, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M. P., Reiner, O., Smith, T. F. and Neer, E. J. (1996). Folding of proteins with WD-repeats:

Comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the protein β subunit. *Biochemistry* 35: 13985-13994.

Gay, N. J., Tybulewicz, V. L. and Walker, J. E. (1986). Insertion of transposon Tn7 into the *Escherichia coli glmS* transcriptional terminator. *Biochem. J.* 234: 111-117.

Girard, M. L., Flores, M., Brom, S., Romero, D., Palacios, R. and Davila, G. (1991). Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *J. Bacteriol.* 173: 2411-2419.

Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durand, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Karst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.-C., Remmel, B., Rose, M., Rusniok, C., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J. and Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-852.

Goethals, K., VanMontagu, M. and Holsters, M. (1992). Conserved motifs in a divergent *nod* box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1646-4650

Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B. (1999). Role for the *oxyS* gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 3833-3836.

後藤和夫・大畑貫一 (1956). 稲の新しい細菌病. 日植病報 21 : 46.

後藤和夫・大畑貫一 (1958). 稲糊枯性細菌病. 日植病報 23 : 155.

Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. A. and Thomas, C. M. (2002). Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. Environ. Microbiol. 4: 856-871.

Gringauz, E., Orle, K. A., Waddell, C. S. and Craig, N. L. (1988). Recognition of *Escherichia coli attT7* by transposon Tn7: Lack of specific sequence requirements at the point of Tn7 insertion. J. Bacteriol. 170: 2832-2840.

Gross, D. C. (1991). Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 247-278.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Hasebe, A., Tsushima, S. and Iida, S. (1998). Isolation and characterization of IS1416 from *Pseudomonas glumae*, a new member of the IS3 family. Plasmid 39: 196-204.

Hasebe, A. and Iida, S. (2000). The novel insertion sequences IS1417, IS1418, and IS1419 from *Burkholderia glumae* and their strain distribution. *Plasmid* 44: 44-53.

Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L. A., Gill, S. R., Nelson, K. E., Read, T. D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M. D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R. D., Nierman, W. C., White, O., Salzberg, S. L., Smith, H. O., Colwell, R. R., Mekalanos, J. J., Venter, J. C. and Fraser, C. M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406: 477-483.

Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M. and Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6602-6606.

久原重松・田部井英夫・佐藤徹・後藤考雄 (1967). イネもみ枯細菌病の発生と葉鞘褐変との関係について. *日植病報* 33 : 323.

Hoskins, J. A., Alborn, W. Jr., Arnold, J., Blaszcak, L., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A., LaGace, R., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M., Peery, R., Robertson, G. T., Rockey, P., Sun, P.-M., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C., Baltz, R. H., Jaskunas, S. Richard,

Rosteck, P. R. Jr., Skatrud, P. L. and Glass, J. I. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183: 5709-5717

Hu, S., Hwang, J., Lee, L., Lee, C., Li P. and Hsieh, Y. (1994). Function analysis of the 14kDa protein of insertion sequence2. *J. Mol. Biol.* 236: 503-513.

Hu, S., Lee, L. and Lei, G. (1996). Detection of an IS2-encoded 46-kilodalton protein capable of binding terminal repeats of IS2. *J. Bacteriol.* 178: 5652-5659.

Huang, J., Carney, B. F. and Denny, T. P. (1995). A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 177: 1259-1267.

Huang, J., Yindeeyoungyeon, W., Carg, R. P., Denny, T. P. and Schell, M. A. (1998). Joint transcriptional control of *xpsR*, the unusual signal integrator of the *Ralstonia solanacearum* virulence gene regulatory network, by a response regulator and a LysR-type transcriptional activator. *J. Bacteriol.* 180: 2736-2743.

飯山和弘・古屋成人・高浪洋一・松山宣明 (1994). イネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*)の産生する酵素と病原力との関連性について. 日植病報 60 : 370.

Iiyama, K., Furuya, N., Takanami, Y. and Matsuyama, N. (1995). A Role of Phytotoxin in Virulence of *Pseudomonas glumae* Kurita et Tabei. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 61: 470-476.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-28.

Jackson, R. W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Sesma, A., Arnolod, D. L., Gibbon, M. J., Murillo, J., Taylor, J. D. and Vivian, A. (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10875-10880.

Jeong, Y. Kim, J. Kim, S. and Kang, Y. (2003). Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Dis.* 87: 890-895.

Kallastu, A., Horak, R. and Kivisaar, M. (1998). Identification and characterization of IS1411, a new insertion sequence which causes transcriptional activation of the phenol degradation genes in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 180: 5306-5312.

Kamiunten, H., Yamaguchi, J. and Wakimoto, S. (1985). Plasmids of *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 51: 506-508.

Kamiunten, H. (1999). Isolation and characterization of virulence gene *psvA* on a plasmid of *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 65: 501-509.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida,

Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7: 331-338.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C. P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. DNA Res. 8: 205-213.

Kearney, B. and Staskawicz, B. J. (1990). Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. J. Bacteriol. 172: 143-148.

King, E. O., Wood, M. K. and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J Lab. Clin. Med. 44: 301-307

Kinscherf, T. G., Coleman, R. H., Barta, T. M. and Willis, D. K. (1991). Cloning and expression of the tabtoxin biosynthetic region from *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 173: 4124-4132.

Kohler, T., Epp, S. F., Curty, L. K. and Pechere, J. C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol 181: 63000-6305

Kullik, I., Toledano, M. B., Tartaglia, L. A. and Storz, G. (1995). Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: Regions

important for oxidation and transcriptional activation. J. Bacteriol. 177: 1275-1284.

Kwong, S. M., Yeo, C. C., Suwanto, A. and Poh, C. L. (2000). Characterization of the Endogenous plasmid from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867: DNA sequence and mechanism of transfer. J. Bacteriol. 182: 81-90.

Latuasan, H. E. and Berends, N. L. (1966). On the biosynthesis of toxoflavin, an azapteridine antibiotic produced by *Pseudomonas cocovenenans*. J. Bio. Chem. 25: 846-852.

Lee, C. Y., O'Kane, D. J. and Meighen, E. A. (1994). Riboflavin synthesis genes are linked with the lux operon of *Photobacterium phosphoreum*. J. Bacteriol. 176: 2100-2104

Levenberg, B. and Sander, N. L. (1966). On the biosynthesis of toxoflavin, an azapteridine antibiotic produced by *Pseudomonas cocovenenans*. J. Bio. Chem. 25: 846-852.

Lin, J. W., Chao, Y. F. and Weng, S. F. (2001). Riboflavin synthesis genes *ribE*, *ribB*, *ribH*, *ribA* reside in the lux operon of *Photobacterium leiognathi*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 284: 587-595.

Mahillon, J., Seurinck, J. and Rompuy L. V. (1985). Nucleotide sequence and structural organization of an insertion sequence element (IS231). from *Bacillus thuringiensis* stratin berliner. EMBO J. 4 : 3895-3899.

Mahillon, J. and Chandler, M. (1998). Insertin sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 725-774.

松田泉・佐藤善司 (1988). イネもみ枯細菌病菌の色素産生と病原性. *日植病報* 54 : 378.

松田泉 (1990) . イネもみ枯細菌病菌 (*Pseudomonas glumae*) の迅速検出方法. *植物防疫* 44: 461-464.

McIver, J., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Bender, G. L. and Rolfe, B. G. (1989). Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* caused by point mutations in *nodD* that result in alternations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 97-106

Mckown, R. L., Orle, K. A., Chen, T. and Craig, N. L. (1988). Sequence requirements of *Escherichia coli attTn7*, a specific site of transposon Tn7 insertion. *J. Bacteriol.* 170: 352-358.

Michael, F., Christman, F., Storz, G. and Bruce, N. A. (1989). OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible gene in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3484-3488.

Michel, B. T., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P. T., Schneider, T. D. and Storz, G. (1994). Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* 78: 897-909

Mitchell, R. E. and Bielecki, R. L. (1977). Involvement of Phaseolotoxin in Haloblight of Toxin : Transport and Conversion to Functional Toxin. *Plant Physiol.* 60: 723-729.

Miyauchi, K., Lee, H. S., Fukuda, M., Takagi, M., Nagata, Y. (2002). Cloning and characterization of *linR*, involved in regulation of the downstream pathway for gamma-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1803-1807.

茂木静夫 (1984). イネもみ枯細菌病の発生生態と防除. 農業および園芸 59 : 679-682.

茂木静夫・対馬誠也 (1984). 最近のイネもみ枯細菌病多発生とその生態. 九州農試昭和 57 年度研究成果概要 47-53.

茂木静夫 (1985). イネもみ枯細菌病の九州における発生の現状. 植物防疫 39 : 393-397.

Nasu, H., Iida, T., Sugahara, T., Yamaichi, Y., Park, K. S., Yokoyama, K., Makino, K., Shinagawa, H. and Honda, T. (2000). A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 strains. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2156-2161

Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R. and Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371: 297-300

Nelson, K., Paulsen, I., Weinel, C., Dodson, R., Hilbert, H., Fouts, D., Gill, S., Pop, M., Martins, D. Santos, V., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J., Timmis, K., Duesterhoft, A., Tummeler, B. and Fraser, C. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4: 799-808.

西山幸司 (1977). 凍結法による植物病原細菌の保存. 植物防疫 31 : 465-467.

Oh, J. I. and Bowien, B. (1999). Dual control by regulatory gene *fdsR* of the *fds* operon encoding the NAD⁺-linked formate dehydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Mol. Microbiol.* 34: 365-376.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. and Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 12215-12220.

Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 255-264.

Rangaswamy, V., Michell, R., Ullrich, M. S. and Bender, C. L. (1998). Analysis of genes involved in biosynthesis of coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 180: 3330-3338.

Rezsohazy, R., Hallet, B., Delcour, J. and Mahillon, J. (1993). The IS4 family of insertion sequence: evidence for a conserved transposase motif. *Molecular Microb.* 9: 1283-1295.

Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspich, F., Allendorf, D. and Bacher, A. (1993). Biosynthesis of Riboflavin: Cloning, sequence, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 4045-4051.

Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Luttgen, H., Gerstenschlager, I. and Bacher, A. (1997). Biosynthesis of Riboflavin: Characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179: 2022-2028.

Rogowsky, P. M., Close, T. J., Chimera, J. A., Shaw, J. J. and Kado, C. I. (1987). Regulation of the *vir* genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 169: 5101-5112.

Ronecker, H. and Rak, B. (1987). Genetic organization of insertion IS2 based on a revised nucleotide sequence. *Gene* 59: 291-296.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.

Sato, H., Kudo, S., Ohnishi, K., Mizoguchi, M., Goto, E. and Suzuki, K. (2001). Nucleotide sequence analysis of 5'-flanking region of salicylate hydroxylase gene, and identification and purification of a LysR-type regulator, SalR. *Eur. J. Biochem.* 268: 2229-2238.

佐藤善司・小磯邦子・岩崎成夫・松田泉・白田昭 (1989). イネもみ枯細菌の産生する毒素. *日植病報* 55 : 353-356.

Schell, M. A. (1986). Homology between nucleotide sequences of promoter regions of *nah* and *sal* operons of NAH7 plasmid of *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 369-373.

Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 597-626

関正男 (1959). イネ粉枯性菌病に関する研究. 佐賀県農業試験場研究報告 2 : 131-147.

Seshadri, R., Paulsen, I., Eisen, J., Read, T., Nelson, K., Nelson, W., Ward, N., Tettelin, H., Davidsen, T., Beanan, M., DeBoy, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Madupu, R., Dodson, R., Khouri, H., Lee, K., Carty, H., Scanlan, D., Heinzen, R., Thompson, H., Fraser, C. and Heidelberg, J. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiellaburnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 5455-5460

Shaw, J. J., Settles, G. and Kado, C. I. (1988). Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of a

nonpathogenic mutant and cloning of a locus for pathogenicity. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 1: 39-45.

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S. and Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 996-1001

白田昭・畔上耕児・本蔵良三・松田泉・佐藤善司 (1986). *Pseudomonas glumae* および類縁菌の毒性物質の生成. *日植病報* 52 : 92-93.

十河和博 (1985). イネもみ枯細菌病の四国における発生の現状. *植物防疫* 39 : 398-402.

Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a GA protein dimer at 2.1Å resolution. *Nature.* 379: 369-374.

Srivastava, S., Urban, M. and Friedrich, B. (1982). Mutagenesis of *Alcaligenes eutrophus* by insertion of the drug-resistance transposon Tn5. *Arch Microbiol.* 131: 203-207.

Stover, C. K., Pham, X.-Q. T., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R. M., Smith, K. A., Spencer, D. H., Wong, G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. and Olson, M. V. (2000). Complete

genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.

Suzuki, F., Zhu, Y., Sawada, H. and Matsuda, I. (1998a). Identification of protein involved in toxin production by *Pseudomonas glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 75-79.

Suzuki, F., Sawada, H. and Matsuda, I. (1998b). Molecular characterization of toxoflavin biosynthesis-related gene in *Pseudomonas (Burkholderia) glumae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 276-281.

鈴木文彦・澤田宏之・畔上耕児(1999). *Pseudomonas glumae* の病原性関連遺伝子の解析:(V)トキシフラビン産生関連領域の構造解析. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 372

Szeverenyi, I., Hodel, A., Arber, W. and Olsasz, F. (1996). Vector for IS element entrapment and functional characterization based on turning on expression of distal promoterless genes. *Gene* 174: 103-110.

田部井英夫 (1976). 東南アジアのイネもみ枯細菌病とマレーシア・サラワク州におけるイネ白葉枯病の発生. *日植病報* 42 : 360.

Taghvi, S., Provoost, A., Mergeay, M. and van der Lelie, D. (1996). Identification of a partition and replication region in the *Alcaligenes eutrophus* megaplasmid pMOL28. *Mol. Gen. Genet.* 250: 169-179.

Taylor, P. A., Schnoes, H., K. and Durbin, R., D. (1972). Characterization of Chlorosis-including Toxins from a Plant Pathogenic *Pseudomonas* sp. *Biochem. Biophys. Acta* 286: 107-117.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22: 4673-4680.

富永時任 (1971). 日本における牧草および飼料作物の病害に関する研究. *農技研報告* C25 : 205-304.

植松勉・吉村大三郎・西山幸司・茨木忠雄・藤井溥 (1976a). イネもみ枯細菌病菌による育苗箱の幼苗腐敗症の発生. *日植病報* 42 : 310-312.

植松勉・吉村大三郎・西山幸司・茨木忠雄・藤井溥 (1976b). 育苗箱のイネ幼苗に腐敗症状をおこす病原細菌について. *日植病報* 42 : 464-471.

植松勉 (1985). イネもみ枯細菌病の病原細菌. *植物防疫* 39 : 403-409.

Ullrich, M. Penaloza-vazquez, A., Biley, A. M. and Bender, C. L. (1995). A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* 177: 6160-6169.

Walker, J. E., Gay, N. J., Saraste, M. and Eberle, A N. (1984). DNA sequence around the *Escherichia coli unc* operon. Completion of the sequence of a 17

kilobase segment containing *asnA*, *oriC*, *unc*, *glmS* and *phoS*. *Biochem. J.* 224: 799-815.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hasimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981). *comb. nov. Microbiol. Immunol.* 36: 1251-1275.

Yamada, T., Lee, P. and Kosuge, T. (1986). Insertion sequence elements of *Pseudomonas savastanoi*: nucleotide sequence and homology with *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8263-8267.

Yoneyama, K., Kono, Y., Yamaguchi, I., Horikoshi, M. and Hirooka, T. (1998). Toxoflavin is an essential factor for virulence of *Burkholderia glumae* causing rice seedling rot disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 91-96.

吉田桂輔・吉村大三郎 (1965). イネもみ枯細菌病の防除対策. *植物防疫* 39 : 410-415.

Zaim, J. and Kierzek, A. M. (2003). The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcriptional factor dimer. *Nucleic. Acids Res.* 31: 1444-1454

Zhang, L. and Takemoto, J. Y. (1986). Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin. Interaction with the plasma membrane of

wild-type and respiratory-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochim. Biophys. Acta. 25: 201-204.

Zhang, Y., Bowley, K. B. and Patil, S. S. (1993). Genetic organization of a cluster of genes involved in the production of phaseolotoxin, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. J. Bacteriol. 175: 6451-6458.

Zheng, M., Aslund, F. and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science 279: 1718-1721