

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii*における三成分制御系 TroK, TroR1, TroR2 によるトロポロン合成制御システム

○三輪 瞬平¹、吉岡 誠訓¹、紀平 絵梨¹、仲宗根 薫²、五十嵐 雅之³、波多野 和樹³、
吉川 博文^{4,5}、兼崎 友⁵、江口 陽子¹、内海 龍太郎¹

(¹近大院農バイオ、²近大工、³微化研、⁴東京農大応生バイオ、⁵東京農大ゲノム解析セ)

イネ苗立枯病は、イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* によって生産される植物毒素 (ファイトトキシン)、トロポロンが主病原因子と考えられている。しかしながら、*B. plantarii* におけるトロポロン生産制御については、明らかにされていない。我々は、*B. plantarii* の全ゲノム解析情報をもとに、遺伝子破壊法を用いて、トロポロン生産制御に関する遺伝子として、二成分情報伝達(TCS)に関与する、ヒスチジンキナーゼ(*TroK*)、レスポンスレギュレーター (*TroR1*, *TroR2*)を明らかにしてきた。本研究において、通常の TCS と異なり (*TroK*, *TroR1*, *TroR2*)の三成分からなるトロポロン合成制御システムの解明を目的にした。

TroK の自己リン酸化活性、リン酸化 *TroK* から *TroR1*, *TroR2* へのリン酸転移を確認するために、それぞれの遺伝子を発現ベクターpET21a にクローニング後、大腸菌 Rosetta-gami において、発現後、histag アフィニティーカラム Ni-NTA を用いて精製した。精製後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いた自己リン酸化及び、リン酸基転移実験を行った。培地中に分泌生産されるトロポロンを評価するために、培養ろ液の吸光波長 320nm を ND-1000 Nano-Drop を用いて測定した。*TroK* の自己リン酸化部位の His ならびに *TroR1*, 2 のリン酸基転移部位の Asp を、相同解析により推定した H253, D52, D46 をアラニン置換した変異株を用いて、トロポロン生産やリン酸化実験、リン酸基転移実験を行った。最後に、これらの変異株から、RNA を採取し、次世代シーケンサーを用いて、RNAseq 解析を行った。

精製された *TroK*、*TroR1*、*TroR2* ならびに *TroKH253A*、*TroR1D52A*、*TroR2D46A* 変異体を用いた自己リン酸化、リン酸基転移実験の結果、*TroK* のヒスチジンキナーゼ活性、*TroKH253-P* から *TroR1D52*, *TroR2 D46* へのリン酸基転移の活性が確認され、3成分制御系であることが確認された。*TroK/TroR1/TroR2* 欠損株における相補実験の結果 *TroK/TroR1/TroR2* すべての遺伝子が相補された場合のみトロポロン産生が回復し、*TroK/TroR1/TroR2*、三種類の遺伝子がトロポロン産生に必要であることが示された。*TroK* のリン酸化部位である H253、*TroR1*、*TroR2* のリン酸化部位である D52、D46 をアラニンに変異したプラスミドを用い、相補実験を行った。*TroKH253-A*、*TroR1D52-A*、*TroR2D46-A* 変異プラスミドは、各変異株のトロポロン生産を回復させることはできなかった。最後に、RNAseq 解析実験の結果、*TroK-TroR1*、*TroK-TroR2* 制御下のトロポロン合成に関与する遺伝子群が存在することが明らかになった。これらの結果から *B. plantarii* において、トロポロン合成には、*TroK*, *TroR1*, *TroR2* の3遺伝子が必須で、*TroKH253*→*TroR1D52*、*TroKH253*→*TroR2D46* への三成分が関与する His-Asp リン酸化リレーによるトロポロン合成制御システムの存在が明らかにされた。