

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目： 基盤研究(S)
 研究期間： 2005～2009
 課題番号： 17108001
 研究課題名（和文） 非病原力遺伝子のサプレッサー活性発現機構の解明と植物病害防除への応用
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism involved in suppressor activity of avirulent genes and its application for control of plant diseases.
 研究代表者
 露無 慎二 (TSUYUMU, SHINJI)
 静岡大学・創造科学技術大学院・教授
 研究者番号： 30090541

研究成果の概要（和文）：

植物は、病原菌との遭遇に際し、抵抗性反応を誘導し、元来病気かからない。病気にかかるのは、例外的な出来事である。本研究では、この抵抗性誘導を抑制する病原菌側の因子を特定し、さらにこれに結合する植物の因子を発見し、この因子の抵抗性誘導分子への結合の特異性により、抵抗性反応のオン、オフが決定されることを明らかにし、これらの因子の改変で抵抗性反応を常にオンにすることによる新しい植物病害防除の戦略を示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：

Plants have evolved to escape from the infection by inducing resistance response upon exposure to pathogens. Disease development can be considered as an exceptional event. In this study, we have identified the bacterial factor to suppress the induction of resistance response in plant and found that this factor determines the specificity of infection by switching on or off the induction of resistance response depending on the specific binding to the effector of the pathogen. From these findings, we could show a new strategy for the control of plant diseases by escaping from the intrinsic induction of resistance response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	20,700,000	6,210,000	26,910,000
2006年度	20,800,000	6,240,000	27,040,000
2007年度	20,100,000	6,030,000	26,130,000
2008年度	20,800,000	6,240,000	27,040,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	85,700,000	25,710,000	111,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：①細菌、②非病原力因子、③遺伝子、④病害抵抗性

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初には、植物病原菌が特定の植物品種に抵抗性反応を誘導するには、病原菌側が持つ非病原力(*avr*)遺伝子と植物側の持つ抵抗性(*R*)遺伝子との間で特異的な組み合

わせが必要であると考えられていた(遺伝子対遺伝子説)。カンキツかいよう病菌の *aplI* 遺伝子は、広範な *Xanthomonas* 属細菌に存在する *avrBs3* 遺伝子ファミリーに属し、その翻訳産物は、タイプ III 分泌機構を介して、

病原細菌体内から植物細胞内に注入され、病徴（かいよう症状）発現に導くことが知られていた。

タイプ III 分泌機構によって注入されたこのグループのエフェクターについては、我々は、植物細胞の違いによって、‘発病’（実際には、抵抗性反応誘導の抑制）、あるいは、全く逆の‘抵抗性誘導’に導くという“avr 二元説”を提唱していた。

そこで、この相反する反応の誘導の切り替えには、植物側の因子との相互作用によると考えられることから、これらの因子との結合の分子機構を明らかにすれば、植物が本来持つ抵抗性誘導反応を選択的にオンにすることが可能になると考えて、本研究を開始した。

2. 研究の目的

殆どすべての植物病原が *avr* 遺伝子を持つが、本遺伝子が抵抗反応の誘導を逆に抑制するサプレッサー活性をもつことを発見した。本研究は、この発見に基づいて、「なよな病気にかからない植物」を作出するための新しい分子育種戦略を確立することを目的とする。

すなわち、① *avr* 遺伝子のサプレッサー活性発現に協同で働く植物因子の活性や生産を抑えたり、② サプレッサー活性を阻害する植物因子の活性や生産を高めることにより、病原との遭遇に際し、抵抗性反応の誘導が保証される植物を作出する戦略を構築することである。

3. 研究の方法

(1) エフェクターやそれらの生産遺伝子の植物細胞内への導入：タンパク質の導入には、非植物病原細菌である *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) にタイプ III 分泌機構に関与する *hrp* 遺伝子クラスターを持つコスミドクローン (pHIR11) の形質転換体に、さらにエフェクター生産遺伝子を形質転換して、この二重形質転換体を植物に接種すると、これらのエフェクターが植物細胞内に注入され、その機能を解析した。また、対象遺伝子を植物細胞内で発現させて、その解析を行う際や、後述の遺伝子サイレンシングを行う際は、*Agrobacterium tumefaciens* のベクターに組み入れた後、これをエレクトロポレーション法で直接導入した。

(2) 植物粗抽出液中の *Avr* 結合分子の単離：結合分子については、それぞれ原理の異なる 2 種の生体分子間相互作用解析装置 (IASYS, Affinix) を用いた。いずれの場合も、大腸菌発現ベクターによる大量生産後、純化したエフェクターを固定化し、これに各種植物の粗抽出液の硫酸アンモニウム塩析分画液をそのまま、あるいは、各種カラム溶出分画を反応させ、結合シグナルで検出する。

これにより、結合タンパク質の一つが、ペクチンメチルエステラーゼ (PME) であることを見いだした。

(3) *Avr* 及び PME の植物細胞内局在性：カンキツかいよう病菌の *apl1* 遺伝子及びカンキツ PME 遺伝子の 5'又は 3'末端側に、Green Fluorescent Protein (EGFP) 又は Diser Red (DsRed) 遺伝子を融合させた遺伝子構築し、これらの融合遺伝子を上記 *A. tumefaciens* の一過的発現用ベクターに組み込み、これらをタバコ葉にエレクトロポレーションにより導入し、共焦点レーザー顕微鏡で発光励起の異なる波長で、それぞれの融合タンパク質の細胞内局在性について観察した。

(4) *Avr* のプロモーター結合解析：*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* の *Apl1*, *X. vesicatoria* の *AvrBs3* それぞれを大腸菌大量発現系で高発現させ、純化した後、これを *upa* ボックスを有する植物プロモーター領域の蛍光標識 DNA を標的としたゲルシフトアッセイを行って、この DNA に結合することが出来るかどうかについて解析を行った。

(5) 新 *hrp* 制御遺伝子の探索：カナマイシン耐性遺伝子カセットの融合によるランダムな変異作製法を用いて、植物病原細菌の感染に不可欠であるタイプ III 分泌機構関連遺伝子 (*hrp*) の *HrpG*, *HrpX* に依存しないで、生産制御に異常をきたし、病原性が著しく低下した変異株をイネ白葉枯れ病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae*) より分離し、*hrp* 遺伝子群の制御について遺伝子融合体を用いて詳細に解析した。

(6) カンキツ葉 *TERT* 遺伝子の単離、かいよう形成に果たす役割解明：真核生物の異常分裂の際に増高するテロメラーゼ活性が、かいよう症状形成時にも見られることを発見したので、本酵素生産遺伝子 *TERT* をカンキツ葉より単離し、その塩基配列を決定した。次に、本遺伝子の転写誘導について、RT-PCR 法により解析した。また、本遺伝子の植物 RNAi 用コンストラクトを作成した。次に、このサイレンシングコンストラクトを前接種した後、カンキツかいよう病菌を多針接種し、その後の水浸病斑の形成、かいよう形成に及ぼす影響について、観察した。

4. 研究成果

(1) *Avr* の二元説の普遍性：*P. fluorescens* (pHIR11) に導入した形質転換体は、一般エリシターの植物細胞への注入により、過敏間反応を誘導する。この形質転換体にさらに、植物病原細菌の各種 *avr* 遺伝子 (*avrBs3*, *avrXa7*, *avrXa10*, *avrB*, *avrRps4*, *avrPto*, *avrRpt2*) を導入した二重形質転換体は、*avrRpt2* 以外のすべての場合、HR を誘導し

なくなった。この時、Pf (pHIR11) 接種では、*HIN1*, *PAL*, *PR1*, *RbohB*等の抵抗性関連遺伝子の転写が増高するのに対し、*avr* 遺伝子をさらに導入した形質転換体は、この増高が見られなくなったことから、殆どの *avr* がサプレッサー活性を有することが示唆された。

(2) ペクチンメチルエステラーゼ (PME) : カンキツかいよう形成因子 *Apl1* 結合タンパク質の存在を生体分子間相互作用解析装置で調べたところ、ジャガイモ、タバコの粗抽出液には存在しないが、カンキツの粗抽出液にのみ存在することがわかった。この解析を指標に、純化し、N 末端の配列は、修飾されており決定できなかったが、中央部の断片のアミノ酸配列の結果から、本タンパク質がペクチンメチルエステラーゼ (PME) であることが示唆された。実際、市販の PME が *Apl1* と結合することが確認された。また、カンキツから *PME* 遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。

(3) *Apl1* と PME の植物細胞内局在 : PME は、翻訳後、中央部あたりでプロセッシングを受け、前半 (インヒビター) 部と後半部 (成熟タンパク) 部とに別れる。励起波長の異なる蛍光タンパク質との融合体を単独、或は混合発現させた植物細胞内に於ける局在性の解析から、両者が細胞内で結合することによって、①PME のプロセッシングが阻害されること、②*Apl1* は、その各局在配列によって植物の核内に移行されるが、結合されることによって、この移行が阻害されることが判明した。*Apl1* は、タバコ、トマトの PME には結合できず、カンキツの PME と特異的に結合することが明らかになった。これらの結果から、*Apl1* がカンキツ細胞内で PME と結合して、それぞれの活性及び局在性を変化することによって、サプレッサー活性とエリシター活性の仕分けをしていることが示唆された。

(4) *upa* ボックスへの結合 : *AvrBs3* が抵抗性遺伝子 *Bs3* のプロモーター領域の *upaBox* に結合するが、*Apl1* も同配列を認識して、結合することをゲルシフトアッセイで示すことができた。このことから、*Apl1* が *upaBox* を介して、植物の遺伝子群のプロモーターに結合して、転写即死することが示唆された。

(5) その他の病原性関連遺伝子の制御機構 : 植物病原細菌が抵抗性反応を誘導するにしても、抑制するにしても、これをコントロールする細菌側の因子 (エフェクター) をタイプ III 分泌機構によって注入するが、この機構構築に関与する遺伝子の生産を司る新規遺伝子 *lrpX* を発見した。植物病害耐性植物作出の際の、別なターゲットをあげることが出来た。

(6) テロメレースのかいよう形成における

役割 : カンキツかいよう症状は、細胞肥大と異常細胞分裂を伴う。そこで、動物等で、このような細胞増生に関与することが知られているテロメレースの活性を調べると、かいよう形成の直前に増高することが観察された。そこで、カンキツよりテロメレーズ遺伝子 (*TERT*) を単離し、その塩基配列を決定した。次に、*TERT* 遺伝子のサイレンシングコンストラクトを作成し、これを前もって一過的にサイレンシングを誘導させた後に、カンキツかいよう病菌を接種したところ、水浸病斑の形成には影響を与えないものの、かいよう形成の時期を遅らせると同時に、病斑拡大も抑えられることが解った。従って、かいよう病耐性付与に、*TERT* 遺伝子の生産抑制が有効であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- 1) L.Q Aini, H Hirata, and S. Tsuyumu, A TonB-dependent transducer is responsible for regulation of pathogenicity-related genes in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 76:132-142 (2010) 査読有
- 2) M.M. Haque, M.S.Kabir, L.Q. Aini, H.Hirata, S.Tsuyumu, SlyA, a MarR family transcriptional regulator, is essential for virulence in *Dickeya dadantii* 3937. *J. Bacteriol.* 191:5409-5418 (2009) 査読有
- 3) G.K. Villena, L. Venkatesh, A. Yamazaki, S. Tsuyumu and M.Gutierrez-Correa. Initial Intracellular proteome profile of *Aspergillus niger* biofilms. *Bioresource Technol.* 16 (1): 101-108 (2009) 査読有
- 4) Md. R. Islum, H. Hirata, S. Tsuge and S. Tsuyumu, Self-regulation of a new pathogenicity-related gene encoding leucine-rich protein LrpX in

- Xanthomonas oryzae* pv. *oryza*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 56-65 (2009) 査読有
- 5) Md. R. Islum, Md. S. Kabir, H. Hirata, S. Tsuge and S. Tsuyumu, A leucine-rich protein, LrpX, is a new regulator of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:66-70 (2009) 査読有
 - 6) G. K. Villena, T. Fujikawa, S. Tsuyumu and M. Gutierrez-Correa, Differential gene expression of some lignocellulolytic enzymes in *Aspergillus niger* biofilms. *Rev. Peru Biol.* 15 (2): 97-102 (2009) 査読有
 - 7) S. Tsuyumu and H. Hirata, Analyses of the genes involved in disease development to construct disease-resistant plants by genetic engineering. *J. Automation, Mobile Robotics and Intelligent Systems (JAMRIS)*. 3 (4): 84-86 (2009) 査読有
 - 8) 露無慎二、藤川貴史、駒井恵子、木村幸、小松節子、平田久笑、本当は、植物は病気にかからない (Plants are basically resistant to any disease) 土と微生物 (*Soil Microorganisms*) 62(2): 102-105 (2008) 査読有
 - 9) H. Yamazaki, H. Hirata and S. Tsuyumu, Type III regulators HrpG and HrpXct control synthesis of alpha-amylase, which is involved in *in planta* multiplication of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74 (3): 254-257 (2008) 査読有
 - 10) H. Yamazaki, H. Hirata and S. Tsuyumu, HrpG regulates typeII secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 138-150 (2008) 査読有
 - 11) Salzberg L et al. H. Hirata, S. Tsuyumu, Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* v. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics*, 9:204. (2008) 査読有
 - 12) T. Joko, H. Hirata and S. Tsuyumu, A sugar transporter (MfsX) is also required by *Dickeya dadantii* 3937 for *in planta* fitness. *J. Gen. Plant Pathol.* 73: 274-280 (2007) 査読有
 - 13) T. Joko, H. Hirata and S. Tsuyumu, Sugar transporter (MfsX) of the major facilitator superfamily is required for flagella-mediated pathogenesis in *Dickeya dadantii* 3937. *J. Gen. Plant Pathol.* 73: 266-273 (2007) 査読有
 - 14) H. Shiotani, T. Fujikawa, H. Ishihara, S. Tsuyumu, and K. Ozaki, A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *J. Bacteriol.* 189 (8): 3271-3279 (2007). 査読有
 - 15) L. Babujee, V. Balakrishnan, A. Yamazaki, S. Tsuyumu. Proteome analysis of the carbonate insoluble outer membrane fraction of the soft-rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) Strain 3937. *J. Proteome Res.* 6 (1): 62-69 (2007) 査読有
 - 16) Y. Desaki ら, 4 番目 S. Tsuyumu. Bacterial Lipopolysaccharides induce defense responses associated with programmed cell death in rice cells. *Plant Cell Physiol.* 47: 1530-1540 (2006) 査読有

- 17) B. Venkatesh, Babujee, H. Liu, P. Hedley, T. Fujikawa, S. Tsuyumu, The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. *J. Bacteriol.* 188 (8): 3088-3098 (2006) 査読有
- 18) T. Fujikawa, T. Yamashita, and S. Tsuyumu, Hypersensitive response suppression by type III effectors of plant pathogenic bacteria. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 176-179 (2006) 査読有
- 19) T. Fujikawa, H. Ishihara, J.E. Leach and S. Tsuyumu, Suppression of defense response in plants by the *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 342 – 349 (2006) 査読有
- 20) M.M. Hossain and S. Tsuyumu, Flagella-mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 34-39 (2006) 査読有

〔学会発表〕 (計 30 件)

- 1) 田中 尊徳ら、*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 由来フラジェリンにおける細胞死誘導必須部位の決定、日本植物病理学会大会、平成 21 年 3 月 27 日、山形市 学生優秀発表賞受賞
- 2) 奥出祥子ら、*Xanthomonas* 属細菌のエフェクター (AvrBs3/PthA ファミリー) の抵抗性遺伝子 *Bs3* プロモーター領域への結合解析、日本植物病理学会大会、平成 21 年 3 月 27 日、山形市 学生優秀発表賞受賞
- 3) 石山佳幸ら、カンキツかいよう病菌の病徴発現に於けるテロメラーズの役割、日本植物病理学会大会、平成 21 年 3 月 27 日、山形市 学生発表賞受賞

〔図書〕 (計 1 件)

真山滋志、難波成任著、植物病理学、文永堂出版、pp. 240-244 (分担執筆) 平成 22 年 3 月

〔その他〕

ホームページ:

http://www.agr.shizuoka.ac.jp/bs/plant_pathology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

露無 慎二 (TSUYUMU SHINJI)
静岡大学・創造科学技術大学院・教授
研究者番号: 30090541

(2) 研究分担者

田中 滋康 (TAKA SHIGEYASU)
静岡大学・創造科学技術大学院・教授
研究者番号: 90146233

塩尻 信義 (SHIOJIRI NOBUYOSI)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 701625681

村田 健臣 (MURATA TAKEOMI)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号: 10293614

瀧川 雄一 (TAKIKAWA YUUCHI)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号: 90163344

道羅 英夫 (DOHRA HIDEO)

静岡大学・遺伝子実験施設・准教授

研究者番号: 10311705

平田 久笑 (HIRATA HISAE)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号: 00432196

(3) 連携研究者 なし