

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

Elucidation of mechanisms involved in suppressor activity of
Avirulent genes and its application for control of plant diseases.

露無 慎二 (Tsuyumu, Shinji)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授



研究の概要

Avr タンパク質は、サプレッサー活性をも持つ。Avr 結合する分子を2分子特定して、これらの分子間の相互作用を解析することによって、Avr が抵抗性誘導とその抑制のどちらの活性を示すかが決定されること、テロメレースが必要であることを発見した。これらの知見をもとに、新しい耐病性植物作出の基本的戦略を示すことができた。

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：宿主認識、非病原力遺伝子、植物、耐病性、サプレッサー、ガード説

1. 研究開始当初の背景・動機

病原細菌は、エリクターを生産して、非宿主抵抗反応を誘導するが、細菌側の非病原力遺伝子の多くが、実は、この非宿主抵抗反応を抑制するサプレッサー活性をもつことを発見していた。また、カンキツかいよう病菌では *avrBs3* 遺伝子ファミリーと高い相同性を示しながら、かいよう形成に導く遺伝子の機能構造の研究実績が十分にあった。即ち、新しい耐病性植物作出戦略を思い立つに至った。

2. 研究の目的

植物は元来病原菌の侵略に耐性を示す事ができ、発病に至るのは、病原菌が特定の宿主植物内のみである。これは、抵抗性の誘導が抑えられるためであるケースを見つけた。このサプレッサー機能を司るのが、非病原力遺伝子である事が分かったので、サプレッサー機能の分子機構を解明して、耐病性植物作出のための戦略を構築する事を目的とした。

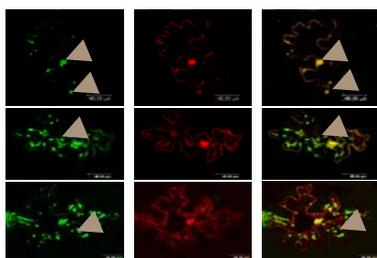
3. 研究の方法

Avr 等のエフェクター分子は、植物の因子と相互作用をして、種々植物反応に導くが、この結合分子を、現有の生体分子間相互作用解析装置等の解析をもとに単離精製し、これらの生産遺伝子をクローニングし、それぞれに蛍光色素融合となるように接続して、これらのコンストラクトを一過的発現後の共焦点顕微鏡による解析を中心とする。申請した設備は、これらの研究のため、核酸、タンパク質をルーチンで解析するために用いた。

4. これまでの成果

Apl1 の結合タンパク質が、カンキツ Pectin Methyl esterase (PME) であることを発見した。PME は、長いペプチドとして翻訳された後、その中央部でプロセッシングを受け、N 末端側の PME インヒビターが切り離されて、成熟 PME になる事が知られている。そこで、Apl1 とそのホモログ、及びカンキツの PME の前駆体、インヒビター、成熟タンパク質のそれぞれについて、異なる励起波長を持つ蛍光タンパク質 GFP 又は DsRed を N 末端又は C 末端に融合させたコンストラクトを作成した。これらカンキツ細胞内で一過的に発現させて、両者の間の結合による局在性の変化を共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。その結果、Apl1 は、カンキツの PME には結合するが、タバコ、トマトの PME とは結合しなかった。また、カンキツの PME は、Apl1 と相同性を示す他の *AvrBs3* ファミリーとは、結合しなかった事から、厳密な特異性がこの結合段階で存在する事が明らかになった。また、Apl1 が前駆体 PME に結合する事によって、プロセッシングを防ぎ、それぞれの局在性が変化する事が明らかになった。即ち、図 1 に示すように、DsRed::Apl1 と GFP::PME を同時に発現させると、夫々を発現させた時の局在性と異なり、図 1 その結果、Apl1 では、修飾後に C 末端側から断片化に導くプロセッシングを受けることが明らかになった。

図1。Apl1 と各種植物の PME のカンキツ細胞内における反応の特異性



- 他の Avr と結合することが知られているシロイヌナズナの第三の因子 RIN4 タンパク質遺伝子のクローニングを行い、AvrBs3 ファミリーと RIN4 との結合について、双方の純化タンパク質を用いて、生体分子間相互作用解析装置 (AffnixQ) で解析した所、これらが確かに RIN4 に結合するだけではなく、RIN4 の分子量が低下する、即ち、プロセッシングを受ける事が示唆された。
- 独立した実験から、カンキツかいようが形成される際、病徴発現の直前にテロメラーゼの活性が上昇する事が明らかになった (図2)。このことから、(1)~(3)の反応を経た後、種々遺伝子群が誘導を受けた後、テロメラーゼの活性を上昇させることが考えられた。RNAi によるジーンノックダウンすると、かいよう形成が抑えられる事が確認され、テロメラーゼがかいよう形成に関与する事が示唆された。しかし、かいよう形成の際、TERT 遺伝子の転写レベルでの誘導は見られず、この活性の上昇は、転写後の制御によるものと考えられた。
- トランスポゾンタギング変異株の解析から、タイプ II 分泌機構 (特に、out システム) が、病原性発現に深く関わる事が判明した。そこで、これらの制御機構を調べた所、hrp 遺伝子群の制御因子 hrpG, hrpX の制御下にある事が明らかになった。この事より、この制御系をコントロールして病害抵抗性に導く戦略の有効性が明らかになった。
- 軟腐病菌において、二分子制御機構の一つ PhoP-PhoQ システムが病原生活史に入るための植物環境察知システムとなっている事が明らかになり、あらたな耐病性植物作出のための標的が明らかになった。また、本システムの変異株と野生型のマイクロアレー解析から、この PhoP-PhoQ システムが低濃度マグネシウム、低糖類、低 pH が植物の環境要因を判定する条件となっており、この下流に多くの既知病原性関連遺伝子の他、未

知病原性関連遺伝子を捉える事ができた。また、細胞膜局在性のプロテオミクス解析から、病原性発現の条件下で、生産されるようになる、又は、修飾されるタンパク質も特定する事ができ、より深く病原性を捉える事ができ、耐病性植物作出の新たな標的分子も明らかになった。

5. これまでの進捗状況と今後の計画
 以上のように、Avr がサプレッサー活性を持つという発見から、このサプレッサー活性の分子機構がわかれば耐病性植物が作出できると期待できるが、これに関与する病原菌側と植物側の因子を特定することができた。今後は、これらの分子の結合様式を明らかにしながら、具体的な耐病性付与のための遺伝的改変方法を遺伝子ノックダウンと、過剰発現によって明らかにする。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

○H. Yamazaki, H. Hirata and **S. Tsuyumu**, HrpG and HrpXct, type III regulators, control synthesis of α -amylase that is responsible for *in planta* multiplication of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Gen. Plant Pathol.** (2008, in print)

○H. Yamazaki, H. Hirata and **S. Tsuyumu**, HrpG regulates typeII secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Gen. Plant Pathol.** (2008, in print)

○L. Babujjee, 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)

○B. Venkatesh, L. Babujjee, H. Liu, P. Hedley, T. Fujikawa, P. Birch, I. Toth, and **S. Tsuyumu**, The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. **J. Bacteriol.** 188 (8): 3088-3098 (2006)

○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)

ホームページ等

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp> 露無慎二