

機関番号：13801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780031

研究課題名 (和文) 植物のかいよう形成に伴う分子相互作用解析

研究課題名 (英文) Analysis of molecular binding interactions for development of citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

研究代表者

平田 久笑 (HIRATA HISAE)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00432196

研究成果の概要 (和文)：

カンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; *Xac*) の病原性因子 Apl1 は、本細菌が引き起こす典型的な病斑「かいよう」の形成に必須な因子であることが知られている。*Xac* の野生株および Apl1 欠損株を用いた比較解析の結果、カンキツのペクチンメチルエステラーゼの酵素活性は Apl1 との特異的な結合により低下すること、また *Xac* の感染に伴うカンキツのテロメラーゼ活性の上昇は Apl1 存在下で誘導され、*Xac* の増殖と病徴発現に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Apl1 (a PthA homologue) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) is one of the AvrBs3/PthA effectors secreted via type III secretion system and a major virulence factor responsible for canker formation. The enzyme activity of pectin methylesterase (PME) that was isolated as the Apl1-binding protein from citrus was affected by binding with Apl1. The symptoms observed in the silencing area of *TERT* (telomerase reverse transcriptase), whose translational product is one of the components of telomerase, were more attenuated compared to those observed in the nonsilencing control area. These results suggest that PME and telomerase activity play important roles in infection and virulence of *Xac*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：植物病原細菌、病原性因子、カンキツかいよう病、カンキツ

1. 研究開始当初の背景

病原微生物は宿主因子との分子相互作用のもとに感染を成立させており、それら因子の特定および挙動解析は、病原性制御機構の解明と病害防除システム

を確立するための基礎的知見となる。カンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; *Xac*) の病原性因子 Apl1 は、本病原細菌による特徴的な病徴である「かいよう」の形成に必須なエフェクターで

ある一方、*Xanthomonas* 属細菌の他種 *AvrBs3/PthA* エフェクターと同様に、非特異的な過敏反応（HR）を抑制する。*AvrBs3/PthA* ファミリーのタンパク質は主に品種特異的抵抗性反応の誘導を司ることが知られているが、*Apl1* に関しては品種特異的抵抗性反応の誘導は報告されておらず、かいよう形成因子として病原性の発現に関わるメカニズムについても知見が乏しい。

2. 研究の目的

本研究は、*Xac* 感染による病徴発現のメカニズム、主に *Apl1* による「かいよう」形成の誘導メカニズムについて明らかにすることを目的とし、次のような解析を行った。

(1) *Apl1* と結合する植物側因子を *in vitro* で探索した結果、複数種のカンキツタンパク質が単離同定された。特に、カンキツのペクチンメチルエステラーゼ（PME）は *Apl1* との特異的な結合が確認されたことから、*in vivo* における挙動解析を試みると同時に、*Xac* 感染時および *Apl1* との結合に伴う酵素活性への影響について解析を行った。

(2) *Xac* の感染組織では、病徴発現に先立ち、カンキツのテロメラーゼ活性の上昇が認められる。この現象が、*Apl1* が関与する病徴発現に特異的な誘導であるか、また活性上昇を抑えた場合の病徴発現への影響を調べることにより、かいよう形成における本酵素の役割について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞内における挙動解析のひとつとして、*Apl1* と PME のそれぞれを DsRed と GFP の蛍光タンパク質との融合体として植物細胞内で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。またアグロバクテリウム法を用いて PME と *Apl1* の過剰発現を誘導し、カンキツ組織における PME の活性変化を調べた。

(2) アグロバクテリウム法を介したヘアピンコンストラクトの導入による RNAi (RNA サイレncing) の誘導により、テロメラーゼの活性抑制を試みた。テロメラーゼのサブユニットのひとつをコードする TERT

(telomerase reverse transcriptase) 遺伝子の発現を抑制し、その条件下における *Xac* の増殖および病徴発現への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 植物細胞内で *Apl1*-DsRed は核に、前駆体 PME-GFP は主に細胞壁に沿った膜上に局在し、両者を共発現させた場合には細胞質や核周辺で共局在するタンパク質が観察され

た。すなわち、*Apl1* との相互作用により前駆体 PME の局在は変化し、膜への局在が阻害されることによりプロセッシングを介した成熟 PME の生成効率に影響を及ぼす可能性が示された。実際に、*Xac* を接種したカンキツ組織における PME の活性を、プレートアッセイにより調べたところ、滅菌水接種部位に比べて低下することが示され、感染により成熟 PME の機能が阻害されることを確認した。また、成熟 PME のカンキツ組織内における一過的発現系を構築したところ、PME の活性が高くなることが認められたが、*Apl1* との同時発現により、その活性は低下することを確認した。以上の結果から、成熟 PME は *Apl1* との結合により酵素活性が低下することが示され、本酵素活性の変化が、かいよう病の発現に関わることが示された。

(2) テロメラーゼのサブユニットをコードする TERT 遺伝子のジーンサイレンシングを誘導した上で *Xac* 野生株を接種した結果、病斑形成が遅延し、さらに感染初期段階から *Xac* の増殖そのものが抑制されることを明らかにした。また、感染部位における組織学的解析から、テロメラーゼの活性抑制に伴い、植物細胞の肥大と分裂の抑制、さらに *Xac* 分布域の減少が確認された。また *Apl1* 欠損株の接種領域においては、野生株接種時に観察されるテロメラーゼの活性上昇は認められず、本酵素の活性上昇は、病原性因子 *Apl1* により制御されている可能性が示唆された。

これらの結果から、*Xac* 感染過程において病原性因子 *Apl1* は、植物タンパク質と相互作用する他、宿主細胞の肥大や分裂に関わる植物側因子の機能および発現を制御することにより、かいよう形成に関わることが示された。

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 9 件)

① Hirata, H. Molecular biological studies on mechanisms involved in pathogenicity of citrus pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.* 76: 415-416 (2010) 学術奨励賞受賞要旨

② Hirata, H., Yamaji, Y., Komatsu, K., Kagiwada, S., Oshima, K., Okano, Y., Takahashi, S., Ugaki, M. and Namba, S. Pseudo-polyprotein translated from the full-length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication. *Virus Res.* 152: 1-9 (2010) 査読有

③Qurata A. L., Hirata, H. and Tsuyumu, S. 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

④Manjurul Haque, M. M., Kabir, S., Qurata A. L., Hirata, H. and Tsuyumu, S. SlyA, a MarR Family Transcriptional Regulator, Is Essential for Virulence in *Dickeya dadantii* 3937. *J. Bac.* 191: 5409-5418 (2009) 査読有

⑤Islam, Md. R., Hirata, H., Tsuge, S. and Tsuyumu, S. Self-regulation of a new pathogenicity-related gene encoding leucine-rich protein, LrpX, in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 56-65 (2009) 査読有

⑥Islam, Md. R., Kabir, Md. S., Hirata, H., Tsuge, S. and Tsuyumu, S. A leucine-rich protein, LrpX, is a new regulator of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 66-71 (2009) 査読有

⑦Yamazaki, A., Hirata, H. and Tsuyumu, S. Type III regulators HrpG and HrpXct control synthesis of α -amylase, which is involved in *in planta* multiplication of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 254-257 (2008) 査読有

⑧Yamazaki, A., Hirata, H. and Tsuyumu, S. HrpG regulates typeII secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 138-150 (2008) 査読有

⑨Salzberg, L. S., Sommer, D. D., Schatz, C. M., and Bogdanove, J. A., et al. (37名のうち27番目) Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. *BMC Genomics* 9: 204-219 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

①石山佳幸, 露無慎二, 平田久笑. 植物病原細菌の発病に関わる宿主テロメラーゼの役割
平成 22 年度科学技術フォーラム、2011 年 3 月 4 日、静岡市(静岡県立大学)

②石山佳幸, 松倉藍, 友松ゆい, 平田久笑・露無慎二. 宿主 *TERT* 遺伝子のサイレンシングがカンキツかいよう病菌の増殖に及ぼす影響

平成 22 年度日本植物病理学会関西部会、2010 年 9 月 30 日、福井市 (AOSSA)

③平田久笑. カンキツ病原体の病原性発現機構に関する分子生物学的研究
平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010 年 4 月 18 日、京都市 (京都国際会議場)

④Hirata, H., Ishiyama, Y., Matsukura, A., Sekiya, T., Ishihara, H., Tamura, K. and Tsuyumu, S. Transient suppression of *TERT* gene attenuates development of citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
第 25 回植物細菌病談話会 (招待講演)、2009 年 11 月 26-27 日、静岡市 (男女共同参画センター あざれあ)

⑤Yamamoto, H., Tanaka, T., Hirata, H. and Tsuyumu, S. Essential region in Flagellin of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* responsible for induction of tobacco cell death
The First Japan-Korea Joint Symposium, Oct 28-Nov 1, 2009, Jeju, Korea

⑥Ishiyama, Y., Sekiya, T., Matsukura, A., Hirata, H., and Tsuyumu, S. A Role of Citrus Telomerase on Canker Formation Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
The First Japan-Korea Joint Symposium, Oct 28-Nov 1, 2009, Jeju, Korea

⑦Hirata, H., Ishiyama, Y., Matsukura, A., Sekiya, T., Ishihara, H., Tamura, K. and Tsuyumu, S. Transient suppression of *TERT* gene attenuates development of citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, July 19-24, 2009, Quebec, Canada

⑧石川典子, 平田久笑, 露無慎二. 細菌感染がタバコモザイクウイルス (TMV) による局部病斑形成に及ぼす影響 (2)
平成 21 年度日本植物病理学会大会、2009 年 3 月 26-28 日、山形市 (山形大学)

⑨石山佳幸, 関谷敏芳, 松倉藍, 平田久笑, 露無慎二. カンキツかいよう病菌の病徴発現におけるテロメラーゼの役割
平成 21 年度日本植物病理学会大会、2009 年 3 月 26-28 日、山形市 (山形大学)

⑩田中尊徳, 井上望, 藤澤侑弥, 平田久笑, 露無慎二. *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
平成 21 年度日本植物病理学会大会、2009 年 3

月 26-28 日、山形市（山形大学）

⑪梅川沙希子，川島沙由梨，平田久笑，露無慎二. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* のかいよう形成因子 *Apl1* の転写後修飾
平成 20 年度日本植物病理学会大会、2008 年 4 月 27 日、松江市（くにびきメッセ）

⑫松倉藍，関谷敏芳，平田久笑，露無慎二. カンキツかいよう病菌によるかいよう形成におけるカンキツ TERT (Telomerase reverse transcriptase) 遺伝子の役割
平成 20 年度日本植物病理学会大会、2008 年 4 月 27 日、松江市（くにびきメッセ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田久笑 (HIRATA HISAE)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00432196