

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月 7日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380030

研究課題名（和文） MAMP認識に関わるシロイヌナズナ受容体様キナーゼの網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of receptor-like kinase involved in MAMP recognition in *Arabidopsis thaliana*

研究代表者

一瀬 勇規（ICHINOSE YUKI）

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：50213004

研究成果の概要（和文）：

微生物（あるいは病原体）由来特有分子パターンとして、細菌の非メチル化 DNA を同定した。病原体由来分子パターンとしてはハーピンの認識機構に取り組み、タバコ野火病菌は、タバコが獲得した高度なハーピン応答性防御機構を回避すべく、ハーピン遺伝子に内部欠損を加え、タバコの認識と防御応答を避けることにより病原性を発揮することを逆遺伝学的に明らかにしたが、シロイヌナズナにおける細菌 DNA やハーピンの受容体分子の同定には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

Bacterial non-methylated DNA was identified as one of microbe/pathogen-associated molecular patterns (MAMP/PAMP). We investigated harpin recognition system in tobacco plant as one of molecular patterns and found that an ancestor of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* might have disrupted harpin gene, *hrpZ* by an internal deletion to evade tobacco defenses and confer the ability to cause disease in tobacco plants. Although we screened the receptor genes for bacterial DNA and/or harpin protein in *Arabidopsis thaliana*, the corresponding mutant lines were not identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：MAMP, PAMP, エリシター, PRR, シロイヌナズナ, 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

病原体を含む微生物に特徴的な分子に保存された一部の分子パターンMAMPは動植物に認識され、防御応答を誘導する。動物ではMAMP

の受容体としてTLRファミリーが同定されている。植物ではこれらMAMPは従来エリシターと呼ばれ、エリシターの認識機構に関わる研究が展開されてきた。植物に防御応答を誘導

するMAMPとして、細菌では鞭毛フラジェリンのf1g22ペプチド、翻訳伸長因子EF-Tuのelf26ペプチドの他、リポ多糖(LPS)、低温ショックタンパク質のRNP-1が報告されている。また、病原体に特有の分子パターン

(Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP)であるハーピンも激しい防御応答を誘導する。一方、卵菌類では壊死誘導タンパク質、トランスグルタミナーゼのpep-13ペプチド、脂質転移タンパク質のエリシチン、 $\beta$ -グルカンが、糸状菌ではキシラナーゼ、 $\beta$ -グルカン、キチン、エルゴステロールなどが知られている。これらMAMP/PAMPに対する植物の受容体として、f1g22に対するFLS2、elf18に対するEFR、キシラナーゼに対するLeEix1/2、 $\beta$ -グルカンに対するGBP、キチンに対するCEBiPが知られているのみである。日本においてはGBPやCEBiPなど糖MAMPに対する受容体研究は進んでいるものの、ペプチドMAMPなど、糖以外のMAMPに対する受容体研究は滞っているのが残念ながら現状である。また、近年シロイヌナズナにおけるf1g22やelf26の受容にはFLS2やEFRだけでなく、別の受容体様キナーゼ(receptor-like kinase, RLK)であるBAK1が必要であることが判明した。このようにRLKはMAMPの受容とその後のシグナル伝達に重要な役割を担っていることが推測されるものの、殆どのRLKの機能は未だ明らかにされておらず、多くのMAMPに対する受容体の解明が望まれていた。

## 2. 研究の目的

研究代表者はこれまでにエンドウ褐紋病菌の糖ペプチドエリシチン、ジャガイモ疫病菌のINF1エリシチン、*Pseudomonas syringae*のハーピンやフラジェリンといった多くのペプチドMAMP/PAMPを用いて抵抗性誘導の発現機構の解明を目指して研究を推進してきた。それらの知見を基盤に、研究代表者はMAMP(LPS、ペプチドグルカンなど)や植物病原菌に特有のPAMP(ハーピンやエリシチン)に対する受容体の殆どが未同定であることから、植物におけるMAMP受容体研究の重要性を認識している。このような状況の中、MAMP/PAMPの処理はMAMP/PAMPの受容体遺伝子を含む多くの受容体様キナーゼ

(receptor-like kinase, RLK)の遺伝子発現を誘導することがフラジェリン(f1g22)やEF-Tu(elf26)を用いたマイクロアレイ解析

により明らかにされた。また、シロイヌナズナでは全部で610のRLK遺伝子が存在し、個々の遺伝子がT-DNAの挿入により破壊されたタグラインを利用することが可能となっている

(<http://signal.salk.edu/about.html>)。実際に、このような手法で実際にEF-Tuに対応する受容体EFRの遺伝子が単離されている(Zipfel et al., 2006)。近年タグラインが益々充実し、両染色体上の同一遺伝子がホモでタグされたノックアウトラインの入手が可能となってきた。このようなゲノム解析情報と遺伝資源の飛躍的な整備向上により、MAMP受容体遺伝子の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

米国ソーク研究所や我が国の理化学研究所などではシロイヌナズナの遺伝子にT-DNAが挿入された変異株のリソースが整備されている。また、これまでにシロイヌナズナで単離されたFLS2やEFRなどのMAMP受容体遺伝子の発現はMAMPの処理で誘導されることも知られている。そこで、MAMP処理により発現が誘導される受容体様キナーゼ遺伝子について、T-DNAが挿入された変異株を入手し、変異がホモ挿入系統であることを確認後、様々なMAMPを処理し、その非感受性変異株をスクリーニングすることにより、受容体遺伝子の同定に取り組むこととした。また、新規MAMP/PAMPとして動物で認識することが知られている細菌の非メチル化DNAのエリシチン活性を解析するとともに、従来から植物病原細菌のPAMPとしてよく知られているハーピンについてその認識機構をタバコとシロイヌナズナにおいて解析した。特にハーピンに対して強い防御応答を誘導するタバコに対しては、ハーピン遺伝子を相補したタバコ野火病菌を用いてタバコの応答を解析し、病原体認識とその回避の進化的な攻防を明らかにしようとした。

## 4. 研究成果

本研究ではまず、新規MAMPとして細菌の非メチル化DNAを同定した。大腸菌から精製したプラスミドDNAを様々な制限酵素で消化後、シロイヌナズナに処理すると活性酸素の生産、カロースの沈着、実生の生育阻害といった防御応答が誘導された。この防御応答はDNAをEcoRIやHaeIIIなどの制限酵素で切断した場合、HapIIやSmaIなどのCpG

配列で切断する制限酵素を用いた場合より強く誘導され、CpG 非メチル化配列の関与が推定された。そこで、細菌 DNA を *EcoRI* で消化後、CpG メチラーゼ処理すると防御応答の誘導能は低下した。また、これらの応答はシロイヌナズナにエンドサートーシス、タンパク質リン酸化酵素、タンパク質合成などの阻害剤を処理することにより低下し、それらのイベントが防御応答に必要であることが判明した。また、これまで単離した全てのタバコ野火病菌のハーピン遺伝子 *hrpZ* は内部が欠損していることを我々は見出しているが、本菌にインタクトな *hrpZ* 遺伝子を相補して、タバコに接種したところ、防御応答を誘導し、病原性が著しく低下することを見出した。これらのことから、タバコ野火病菌ではタバコが獲得した高度なハーピン応答性防御機構に対応するべく、ハーピン遺伝子に内部欠損を加え、タバコからの認識を避け、病原性を発揮してきたとの仮説を提唱した。このように病原細菌と植物との進化の攻防の一場面を明らかにすることができたが、シロイヌナズナにおける細菌 DNA やハーピンの受容体分子の同定には至らなかった。

ハーピン以外のMAMPとしては、タイプ4線毛ピリンのアミノ末端の配列が種を超えて保存されていること、ピリンの欠損変異株 ( $\Delta pilA$ ) と野生株をシロイヌナズナに接種した場合に、ピリンの欠損変異株接種では弱い防御応答しか誘導しないことから、ピリンは新規MAMP候補である可能性を考え、そのエリシター活性の検定を試みてきたが、N-末端のペプチド合成は著しく高い疎水性のため成功せず、同様な理由で大腸菌における組換えタンパク質の精製にも至らなかった。また、*Agrobacterium* を用いたピリンの一過的発現もバックグラウンドが高く、エリシター活性を評価することはできなかった。本研究では、多くのLRR-PK遺伝子のホモ挿入変異株シロイヌナズナのリソースを得た。これらは今後活用できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計2件)

- ① Tsunemi, K., Taguchi, F., Marutani, M., Watanabe-Sugimoto, M., Inagaki, Y., Toyoda, T., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2011) 査読有, Degeneration of *hrpZ* gene in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* to evade tobacco defence: an arms race between tobacco and its bacterial pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 12(7): 709-714.

- ② Yakushiji, S., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2009) 査読有, Bacterial DNA activates immunity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75 (3) 227-234.

〔学会発表〕 (計17件)

- ① 松本伊世・田口富美子・向原隆文・一瀬勇規, *Ralstonia solanacearum* RS1000 株のエフェクター Rip36 によるナス台木植物トルバムビガーに対する過敏感反応誘導機構. 平成24年度日本植物病理学会大会, 2012, 3, 28-30. 福岡.
- ② Iyo Matsumoto, Fumiko Taguchi, Yoshishige Inagaki, Takafumi Mukaihara and Yuki Ichinose, Mechanism of hypersensitive reaction in *Solanum torvum* Sw. cv. Torubamubiga by the inoculation with *Ralstonia solanacearum* RS1000. The 2<sup>nd</sup> Korea-Japan Joint Symposium in Plant Pathology 2012, 3, 27. 福岡.
- ③ 一瀬勇規・田口富美子, 植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* のべん毛・タイプIV線毛と多剤耐性. 第46回緑膿菌感染症研究会 2012. 2. 17-18. 東京.
- ④ Yuki Ichinose, Chi Linh Nguyen, Fumiko Taguchi, Role of flagellum and pilus in motility and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. IUMS 2011 (International Union of Microbiological Societies) 2011. 9.6-10. 札幌.
- ⑤ 一瀬勇規・田口富美子, 岡山大学における harpin, flagellin, pilin 研究とこれから, 高知大学研究拠点プロジェクト「植物健康基礎医学」2011. 8. 7-8. 高知.
- ⑥ Ichinose Y., Asai S., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T. and Taguchi F. Flagellum-mediated motility and pilus-mediated sessility are important for virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. Asian Association of Societies for Plant Pathology (AASPP) and the Australasian Plant Pathology Society (APPS), 2011, 4, 26-29. Darwin, Australia
- ⑦ 知久 和寛, 山本雅信, 亀山眞由美, 小野裕嗣, 吉田 充, 田口富美子, 一瀬勇規, 石井 忠, ダイズ斑点病原細菌由来リポ多糖の O-抗原糖鎖の構造解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会 2011. 3. 25-28. 京都.
- ⑧ Nguyen L. C., Taguchi, F., Ohnishi-Kameyama, M., Yamamoto, M., Yoshida, M., Ishii, T., Ichinose, Y. Type IV pilin is glycosylated in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 and required for surface motility and virulence. 平成22年度日本植物病理学会関西西部会 2010. 9. 30 - 10.01, 福井

- ⑨ Ichinose Y., Suzuki T., Taguchi F., Role of flagella-mediated motility and pili-mediated sessility in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation, 2010. 9. 20-24. Miyazaki.
- ⑩ Taguchi, F., Ichinose, Y., Role of flagellin in motility, quorum sensing and tolerance to multidrugs in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 8<sup>th</sup> *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, 2010. 8. 31. – 9. 3. Oxford, UK.
- ⑪ Taguchi F., Nguyen L.C., Iwaki M., Suzuki T., Yamamoto M., Ohnishi-Kameyama M., Yoshida M., Konishi T., Ishii T., Ichinose Y. Structure and function of flagellin glycan in *Pseudomonas syringae*. The 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 2010. 6. 7-11., Reunion, France.
- ⑫ 田口富美子・鈴木智子・稲垣善茂・豊田和弘・白石友紀・一瀬勇規. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* における線毛欠損変異株の諸性質の解析. 平成 22 年度日本植物病理学会大会. 2010, 4, 18-20. 京都.
- ⑬ 一瀬勇規, 田口富美子, 植物細菌の病原性因子と MAMP/PAMP. 第 83 回日本細菌学会総会 2010. 3. 27-29. 横浜.
- ⑭ Ichinose Y., Taguchi F., Nguyen L.C., Naito K., Suzuki T., Inagaki Y., Toyoda K. and Shiraishi T. Glycosylation of Bacterial Flagellins and Its Role in Motility and Virulence. 第 10 回日米科学セミナー, 2010. 1. 24-28. Corvallis, OR, USA.
- ⑮ Kana Naito, Fumiko Taguchi, Tomoko Suzuki, Yoshishige Inagaki, Kazuhiro Toyoda, Tomonori Shiraishi and Yuki Ichinose, Amino acid sequence of bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 is required for virulence. The 2009 KSPP Fall Meeting and the 1<sup>st</sup> Japan-Korea Joint Symposium 2009. 10. 28-31. JeJu Korea.
- ⑯ Yuki Ichinose, Tomoko Suzuki, Yoshishige Inagaki, Kazuhiro Toyoda, Tomonori Shiraishi and Fumiko Taguchi, Role of Siderophore pyoverdine in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. The 2009 KSPP Fall Meeting and the 1<sup>st</sup> Japan-Korea Joint Symposium, 2009. 10. 28-31. JeJu Korea.
- ⑰ 田口富美子・鈴木智子・稲垣善茂・豊田和弘・白石友紀・一瀬勇規. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* の病原性におけるシデロフォア役割. 平成 21 年度日本植物病理学会関西部会 2009. 10. 17-18. 神戸.

[図書] (計 1 件)

- ① 一瀬勇規. 第 4 章 細菌病とファイトプ

ラズマ病 養賢堂、新編 植物病理学概論 (白石友紀, 秋光和也, 一瀬勇規, 寺岡 徹, 吉川信幸 共著) 2012, pp. 62-85.

- ② 一瀬勇規, 秋光和也, 吉川信幸. 第 1 2 章 植物病理学におけるバイオサイエンス 養賢堂、新編 植物病理学概論 (白石友紀, 秋光和也, 一瀬勇規, 寺岡 徹, 吉川信幸 共著) 2012, pp. 266-280.
- ③ Ichinose, Y., Taguchi, F., Nguyen, L. C., Naito, K., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K. and Shiraishi, T. (2011) Glycosylation of bacterial flagellins and its role in motility and virulence. *In* Genome-Enabled Analysis of Plant-Pathogen Interactions. (Wolpert, T., Shiraishi, T., Collmer A., Glazebrook, J. and Akimitsu, K. eds.) APS Press (St. Paul, Minnesota, USA) p. 215-224.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

一瀬 勇規 (ICHINOSE YUKI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：50213004

### (2) 研究分担者

稲垣 善茂 (INAGAKI YOSHISHIGE)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号：50280764

### (3) 連携研究者

(該当無し)