

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370026

研究課題名(和文)植物病原菌の生産する新奇サイトカイニン様物質の生合成経路の解明

研究課題名(英文)Study for biosynthesis pathway of novel cytokinins in phytopathogens

研究代表者

榊原 均(Sakakibara, Hitoshi)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター

研究者番号：20242852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：帯化病原菌*Rhodococcus fascians*がもつ病原性遺伝子座(fas)にコードされる6つの遺伝子(FAS1 to FAS6)およびその近傍のメチル化転移酵素類似遺伝子(MT1, MT2)の機能について研究を行った結果、FAS4とMT1, MT2により生産される、新奇のサイトカイニン(1MeiP, 2MeiP)を同定した。1MeiP, 2MeiPは、植物体内での安定性が植物由来のものよりも高く、より効果的にサイトカイニン作用を発揮することが示唆された。さらにFAS2, FAS3, FAS4, FAS5の働きにより、さらに別のサイトカイニンが生産されることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：*Rhodococcus fascians* induces leafy gall symptoms reminiscent of cytokinin overproduction. We have revealed that *R. fascians* produces two methylated cytokinins (MeCKs, 1MeiP and 2MeiP) by the action of three enzymes MT1, MT2, and FAS4. The initial substrate of MeCKs is isopentenyl diphosphate, a different substrate from that for the biosynthesis of canonical cytokinins. The MeCKs can activate CK-responsive pathways in the host plant and are more stable towards homeostasis mechanisms. We propose that the biological significance of MeCKs is that they function as CK-mimics, thereby contributing to pathogenesis. We also revealed that FAS2, FAS3, FAS4, and FAS5 produce another novel cytokinin-like compounds although the structure has not been determined.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物ホルモン 植物病原菌 サイトカイニン 代謝

### 1. 研究開始当初の背景

*Rhodococcus fascians* は植物に感染すると leafy gall と呼ばれる奇形腫瘍形成や帯化を起こす。また、*Streptomyces turgidiscabies* は、ジャガイモそうか症の病原菌であるが、人為的に植物に感染させると同様の leafy gall を形成する。特に *Rhodococcus fascians* は国内での生菌の取り扱いが厳しく制限されるほど、深刻な被害が予想される病原菌である。これらの病症は FAS オペロン(FAS1-FAS6)にコードされる一連の酵素遺伝子の働きにより誘発されることが明らかにされているが、各 FAS 酵素の機能についてはまだほとんどわかっていなかった。

FAS1 はチトクロム P450 に相同性を持ち、FAS2, FAS3 はトランスケトラーゼの a, b サブユニットに類似した一次構造を持つ。FAS4 は サイトカイニン生合成初発酵素の IPT、FAS5 はサイトカイニン分解酵素 CKX、FAS6 はサイトカイニンの活性化酵素 LOG に類似している。つまり、FAS オペロンの一部はサイトカイニンの生合成や代謝に関わることは、遺伝子の構造などから予想されていた。ただしこれら FAS 酵素群の作り出す最終的な生産物の構造や機能は同定されていない。これら 6 つの FAS 遺伝子群に加え、その近傍には 2 つのメチル基転移酵素をコードすると予想される遺伝子 (MT1, MT2) が存在する。この 2 つの遺伝子の破壊株は leafy gall 形成能が無くなることから、FAS 遺伝子群との関連が指摘されているが未解明であった。

### 2. 研究の目的

leafy gall などの植物奇形 (帯化) を発症させる植物病原菌 *Rhodococcus fascians* と *Streptomyces turgidiscabies* のゲノム上の病原性領域 (PAI: pathogenic island) に共通して存在する、FAS オペロンとその近傍の機能未知の MT1, MT2 遺伝子群の代謝機能を明らかにする。さらにこれら遺伝子によって合成される植物病原菌特異的な新奇サイトカイニン様物質の同定と、その物質の宿主植物内での作用を明らかにすることで、宿主植物のホルモン代謝・情報伝達系を巧みに利用した植物病原菌の感染・発症戦略のメカニズムを分子レベルで理解する。

### 3. 研究の方法

主に以下の 2 つの点に焦点を絞り研究を行った。

(1) FAS 遺伝子群上流にコードされる機能未知のメチル化転移酵素類似遺伝子 (MT1, MT2) の機能同定。

(2) FAS 遺伝子群により生産されるサイトカイニン様物質の解析と、FAS 遺伝子群の機能研究。

*Rhodococcus fascians* は生菌の取り扱いが厳しく制限されているため、*R. fascians* から抽出した DNA から研究対象遺伝子を増幅し、

大腸菌内で過剰発現させた組換えタンパク質と、FAS 遺伝子群と MT を様々な組合せで発現させた大腸菌の培養上清内に含まれるサイトカイニン様物質の質量分析器を利用した解析により、生成物質の構造とこれら遺伝子の機能について検討を行った。

*R. fascians* 感染時に合成されるサイトカイニン様物質の解析については、生菌の使用が認められているつくば理研バイオリソースセンター内の微生物材料開発室において、タバコへの感染を行い、強酸有機溶媒で滅菌不活化した試料としたのちに、ホルモン解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) FAS 遺伝子群上流にコードされる機能未知のメチル化転移酵素類似遺伝子 (MT1, MT2) の機能同定

大腸菌内において FAS4 と MT1, MT2、MT1 および MT2 を共発現させ、その培養液に漏出してくるサイトカイニン様物質の解析を質量分析したところ、既知の iP に加え、FAS4 と MT2 の共発現で植物では見られない質量  $m/z$  218 の新奇のサイトカイニン様物質のピークが、FAS4 と MT1, MT2 の共発現で  $m/z$  232 のピークが検出された (図 1)。

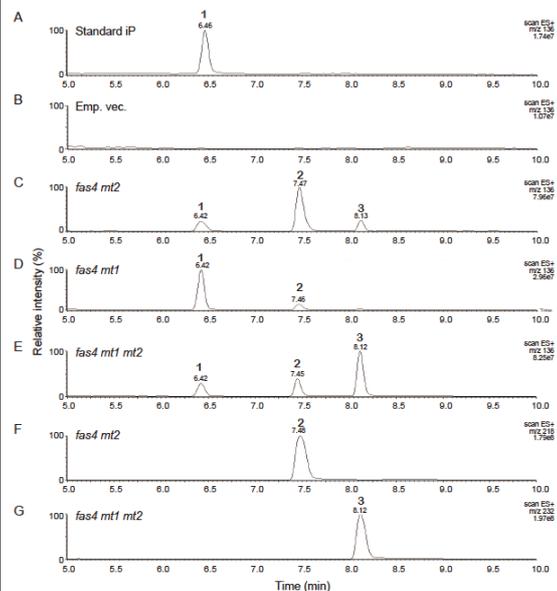


図 1 大腸菌培養液中に漏出されたサイトカイニン様物質の LC-MSMS による解析

A-E,  $m/z$  136 (アデニン環の検出) のクロマトグラム、F,  $m/z$  218 のクロマトグラム、G,  $m/z$  232 のクロマトグラム

次に、新しく検出された  $m/z$  218, 232 の物質の構造を決めるため、大量精製を行い、NMR 解析と精密質量解析を行った結果、プレニル側鎖末端がメチル化修飾されたサイトカイニン様物質であることが明らかになった (図 2)。

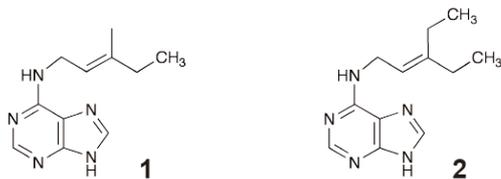


図2 構造決定された新奇サイトカイニン  
1, 1MeiP; 2, 2MeiP

これらの物質を 1MeiP (m/z 218), 2MeiP (m/z 232) と命名し、これらが *R. fascians* が植物に感染した時に実際に検出されるか否かをタバコを用いて検証した。その結果、1MeiP, 2MeiP とともに感染後 3 日後にピークをもつ形で蓄積していた (図3)。1MeiP に比べ 2MeiP の蓄積のほうが数倍多かった。

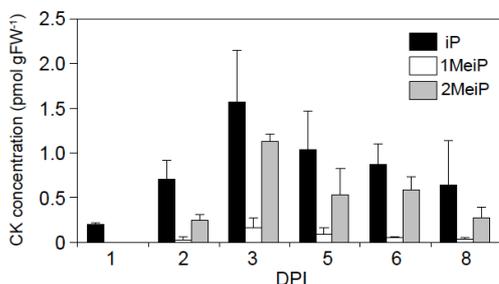


図3 *R. fascians* を感染したタバコ内におけるサイトカイニンの蓄積  
DPI, days post infection

このサイトカイニン様物質にサイトカイニンとしての活性があるか否かを、シロイヌナズナの根の伸長に対する影響、サイトカイニン応答性の遺伝子発現 (*ARR5*, *ARR6*) への影響などを調べた結果、1MeiP, 2MeiP とともに既知のサイトカイニンと同等の活性をもつことが明らかになった (図4)。以上のことから *R. fascians* の FAS 遺伝子群は新奇のサイトカイニンを合成する機能を持つことが明らかになった。

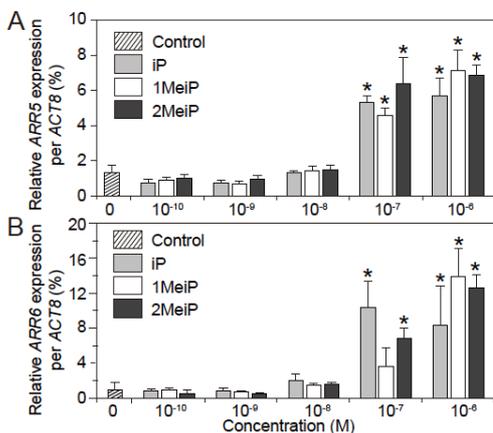


図4 *ARR5*, *ARR6* 発現誘導に対する効果

このメチル化サイトカイニンの持つ特性について、植物体内での安定性をトレーサー実験によって検証したところ、植物内生のサイトカイニン (iP) に比べ、生体内での半減期が長かった。また、サイトカイニン分解酵素 CKX に対する反応性を検証したところ、メチル化サイトカイニンは CKX の基質としてほとんど反応しないことが明らかになった。つまり *R. fascians* は植物体内でより長く作用するサイトカイニンを合成することがわかった。

つぎにメチル化サイトカイニンの合成機構について詳細に解析した。植物やアグロバクテリウムでのサイトカイニン合成のプレニル基供与体の基質はジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) であるが、このメチル化転移酵素の基質は DMAPP ではなく、イソペンテニルニリン酸 (IDP) であった。さらに MT1 と MT2 には作用順序があり、2MeiP を合成するには MT1, MT2 の順番で作用することが必要であることが明らかになった (図5)。

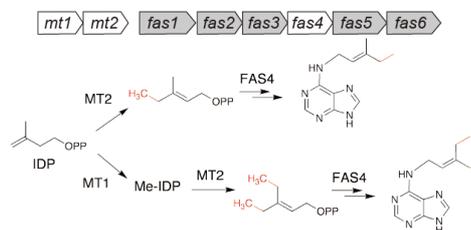


図5 今回明らかになったメチル化サイトカイニンの合成機構

## (2) FAS 遺伝子群により生産されるサイトカイニン様物質の解析と、FAS 遺伝子群の機能研究

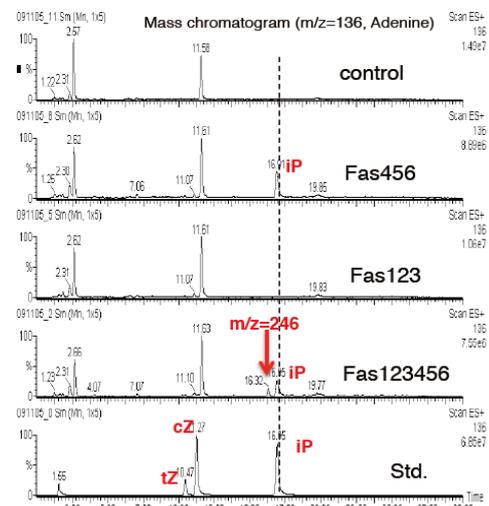


図6 FAS 遺伝子群を発現させた大腸菌培養液中に漏出されたサイトカイニン様物質の LC-MSMS による解析 (m/z 136 (アデニン環の検出) のクロマトグラム)

FAS 遺伝子群の機能について情報を得るために、FAS 遺伝子群を様々な組み合わせで大腸菌内で発現させ、培養液中に漏出するサイトカイニン様物質を質量分析した。その結果、FAS 遺伝子群を全て発現した時に m/z 246 の新奇のサイトカイニン様物質を検出した (図 6)。

さらにこの物質を生産するのに最小限の FAS 遺伝子の組合せを調べたところ、FAS2, FAS3, FAS4, FAS5 の 4 種で生産が可能であることが明らかになった (図 7)。この m/z 246 の物質が FAS 遺伝子群の最終生成物であるかどうかは不明であり、この物質の構造決定を含め、今後さらに検討を進める必要がある。

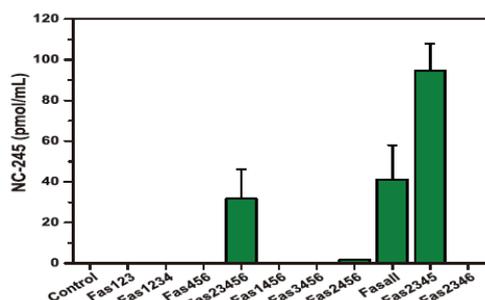


図 7 m/z 246 物質を生産する最小限の FAS 遺伝子の組合せ

## 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 3 件)

Osugi, A. and Sakakibara, H. (2015) How do plants respond to cytokinins and why is this important? *BMC Biology* 13: In press. [査読有]

Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K.Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W.Y., Martinoia, E., Sakakibara, H. and Lee, Y. (2014) Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.* 111: 7150-7155. doi: 10.1073/pnas.1321519111. [査読有]

Kiba, T., Takei, K., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2013) Side-chain modification of cytokinins control shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 27: 452-461. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.004. [査読有]

[学会発表](計 7 件)

Sakakibara, H. A role of cytokinins in coordinated response to nutritional

cues to optimize plant growth and development. Molecular and Cellular Life Science 2015 (MCLS 2015), 2015/5/8, Surabaya, Indonesia.

Sakakibara, H. Regulation of cytokinin biosynthesis and activity in response to nutritional cues to optimize growth and development. Auxins and Cytokinins Plant Development 4<sup>th</sup> International Symposium. (ACPD 2014), 2014/6/30, Plague, Czech Republic.

Sakakibara, H. Dual regulation of *de novo* cytokinin biosynthesis in response to nitrogen nutrition: the role of glutamine metabolism as an additional signal. Nitrogen 2013, 2013/11/19, Puerto Varas, Chile.

Venkatesan, R. Towards elucidating the role of FAS genes in plant pathogenesis. International Chemical Ecology Conference 2013, 2013/8/22, Melbourne, Australia

Sakakibara, H. Regulation of plant growth and development via fine control of cytokinin activity. 21<sup>th</sup> International Conference on Plant Growth Substances, 2013/6/21, Shanghai, China.

Sakakibara, H. Regulation of plant development via fine control of cytokinin activity. 10<sup>th</sup> International Congress on Plant Molecular Biology, 2012/10/23, Jeju, Korea.

Sakakibara, H. How the LOG-dependent cytokinin activation is important for plant growth and development? 3<sup>rd</sup> International symposium Intracellular Signaling And Bioactive Molecules Design (National Academy of Science of Ukraine), 2012/9/18, Lviv, Ukraine.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]  
ホームページ等  
<http://pps.riken.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
榊原 均 (SAKAKIBARA HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・グループディレクター  
研究者番号：20242852

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
Radhika Venkatesan  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・外国人基礎科学特別研究員

小嶋美紀子 (KOJIMA MIKIKO)  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・技師

上田七重 (UEDA NANAE)  
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学  
研究センター・テクニカルスタッフ