

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450061

研究課題名(和文) エクステンシンおよびレクチンの分解に関わるトマト斑点細菌病菌由来新規酵素群の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of novel enzymes from *Xanthomonas euvesicatoria* for extensin and lectin

研究代表者

中村 正幸 (Nakamura, Masayuki)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：90404475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年ビフィズス菌より世界で初めて発見された新規のアラビノシダーゼ酵素群がトマト斑点細菌病菌(Xcv)にも存在することが分かった。そこで、本研究では、Xcv由来のこれら新規酵素群の機能解析を行った。その結果、3つの酵素群(XcvHypBA1、XcvHypBA2、XcvHypAA)が、植物細胞壁に存在する病害抵抗性に関わる糖タンパク質(エクステンシン、ナス科レクチン)上のアラビノオリゴ糖鎖を協調的に働き全て分解することが明らかとなった。また、これら酵素群の遺伝子は、感染トマト上で大きく発現が促進され、病原性発揮に重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently three novel arabinosidases have been found in Bifidobacteria and the orthologs of the enzymes exist on the genome of the plant pathogenic bacterium, *Xanthomonas euvesicatoria* (Xcv). In this work, the three orthologs (XcvHypBA1, XcvHypBA2, XcvHypAA) derived from Xcv were analyzed to elucidate their functions. As a result, it is revealed that the three enzymes work together and have functions to degrade arabino-oligosaccharides on glycoproteins such as extensin and lectin that are thought to be involved in the plant immune system. The expression of the enzyme genes were highly induced in infected plants, suggesting that the three enzymes might play an important role in pathogenicity.

研究分野：植物病理学

キーワード：Xanthomonas アラビノシダーゼ エクステンシン ナス科レクチン 病原性

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピフィズス菌より、新規のアラビノシダーゼ群が発見され、そのオルソログが植物病原細菌では、*Xanthomonas* 属菌のみに存在していることが分かった。また、本酵素群の基質は、自然界では、植物細胞壁にのみ存在している糖タンパク質であるエクステンシンとナス科レクチンのみであり、これら糖タンパク質は、病害抵抗性に関わっていることが知られている。さらに、*Xanthomonas* 属菌の保持する新規アラビノシダーゼのプロモーター領域には、HrpX の結合する PIP box 様配列も認められた。以上のことから、*Xanthomonas* 属菌のアラビノシダーゼが病原性に関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

トマト斑点細菌病菌(UPB139 株)のゲノム上に存在する新規アラビノシダーゼの機能解析と病原性との関わりについて明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

UPB139 株のゲノム DNA より、各アラビノシダーゼ遺伝子をクローニングし、組換えタンパク質を発現後、機能を特定した。基質特異性は、TLC および HPAEC-PAD を用いて調査した。また、各遺伝子の発現パターンを、定量 PCR を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) xcv2724、xcv2728、xcv2729 の各アラビノシダーゼの組換えタンパク質発現を行った。xcv2724 は、発現ベクター pET-23b と大腸菌 BL21(DE3)により、xcv2729 は、pCold TF と BL21(DE3)により、xcv2728 は、pBIC と *Brevibacillus choshinensis*によりそれぞれ、可溶化タンパク質を得ることに成功した(図 1)。

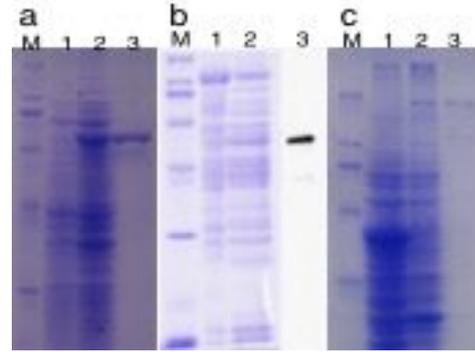


図 1 発現タンパク質の SDS-PAGE. a, xcv2724; b, xcv2728; c, xcv2729. M: マーカー, レーン 1:モック, レーン 2:可溶化タンパク質, レーン 3:精製タンパク質.

(2) 各発現タンパク質の機能解析を行った結果、xcv2724 は、ピフィズス菌由来のオルソログと異なり、-Ara2(アラビノースが2糖結合したもの)に対しては、ごく僅かな活性を示し、Ara2-Hyp(ヒドロキシプロリンにアラビノース 2 つが結合したもの)や Ara-Hyp(ヒドロキシプロリンにアラビノース 1 つが結合したもの)に対し、アラビノースを特異的に遊離することが分かった(図 2a)。この基質特異性は、これまでに知られていない特徴であり、本酵素は、ピフィズス菌も保持していない新規のアラビノシダーゼである可能性が考えられた。次に、xcv2728 は、Ara4-Hyp(ヒドロキシプロリンにアラビノース 3 つが結合しさらにもう 1 つのアラビノースが結合したもの)から、結合したアラビノースを特異的に遊離することが分かった(図 2b, 3, 4)。最後に、xcv2729 は、Ara3-Hyp(ヒドロキシプロリンにアラビノース 3 つが結合したもの)から -Ara2 を遊離する働きがあることが分かった(図 2c, 5)。

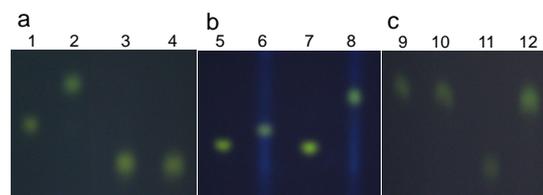


図 2 TLC を用いた基質特異性の解析. 1:Ara2-Hyp, 2:Ara2-Hyp + xcv2724, 3: Ara3-Hyp, 4: Ara3-Hyp +

xcv2724, 5, Ara4-Hyp, 6, Ara4-Hyp + xcv2728, 7, Ara4-Hyp + xcv2729, 8, Ara4-Hyp + xcv2728 + xcv2729, 9, Ara2-Hyp, 10, Ara2-Hyp + xcv2729, 11, Ara3-Hyp, 12, Ara3-Hyp + xcv2729.

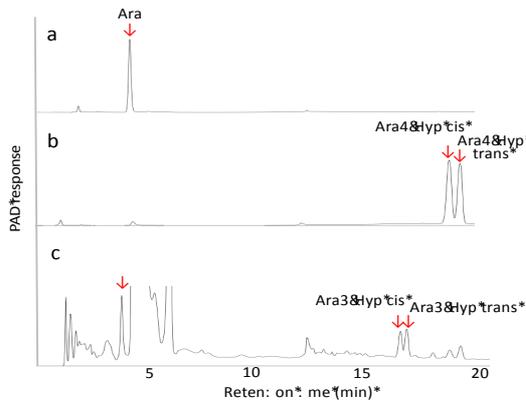


図3 HPAEC-PADによるxcv2728の基質特異性の解析. a, Araのみ; b, Ara4-Hypのみ; c, Ara4-Hyp+xcv2728

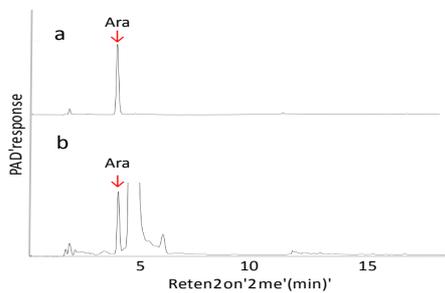


図4 xcv2728のトマトレクチンに対する酵素活性. a, Araのみ; b, トマトレクチン+xcv2728.

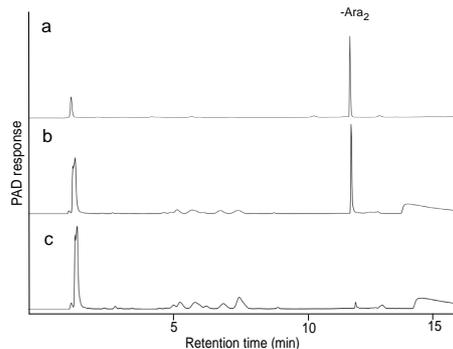


図5 xcv2729のトマトレクチンに対する酵素活性. a, -Ara2のみ; b, トマトレクチン+xcv2728, c, トマトレクチンのみ.

(3)xcv2728、2729はRT-PCRの結果オペロンを構成していることが分かった(データは示していない)。これらの遺伝子のプロモーター領域には、HrpXの結合するPIP box様配列

(TTCG-N₁₆-TTTCG)が認められた。そこで、xcv2728、2729の発現解析を行ったところ、hrp誘導培地および接種植物体(Micro-Tom)上で、発現が誘導されることが明らかとなった(図6ab)。また、hrpX破壊株は、hrp誘導培地で、xcv2728、2729の発現誘導が認められなかったことから、本オペロンは、HrpXにより制御されていることが分かった(図6c)。

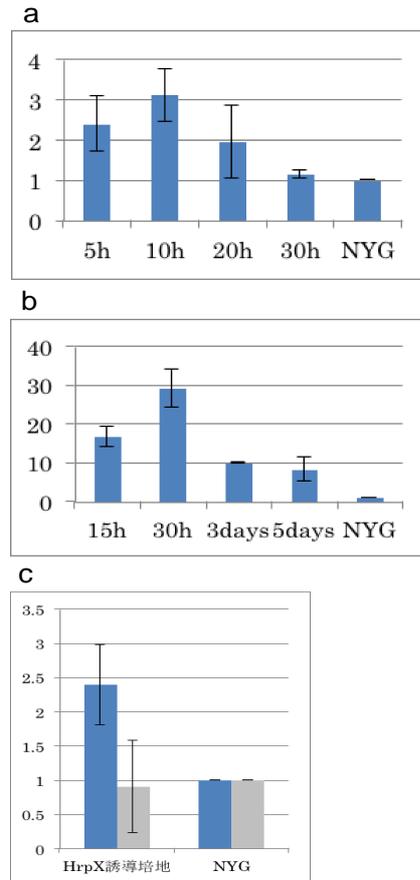


図6 xcv2728-2729 オペロンの発現解析. a, hrp誘導培地での発現解析. b, 接種植物体(Micro-Tom)での発現解析. c, hrpX破壊株を用いた発現解析. 青色:野生株, 灰色: hrpX破壊株.

xcv2724は、プロモーター領域にPIP box様配列は無いものの、hrp誘導培地および接種植物体上で発現の誘導が認められ(図7ab)、hrpX破壊株では、hrp誘導培地での発現誘導が認められなかった(図7c)。

(4)以上の結果をまとめると、以下のことが考えられる。植物細胞壁に存在しているエクステンシンとナス科レクチン上には、

Ara4-Hyp、Ara3-Hyp、Ara2-Hyp、Ara-Hyp が存在するが、中でも Ara4-Hyp が半分以上を占めていることが知られている。つまり、この最も多い Ara4-Hyp に対し、まず xcv2728 が作用し、結合のアラビノースを遊離し、Ara3-Hyp へと変換する。次に、生じた Ara3-Hyp と既存の Ara3-Hyp に対し、xcv2729 が作用し、-Ara2 が遊離される。最後に生じた Ara-Hyp と既存の Ara2-Hyp に対し、xcv2724 が作用し、結果的に糖タンパク質上の全てのアラビノースが遊離されることとなる(図 8)。糖鎖の無くなった糖タンパク質は、不安定となりプロテアーゼによる分解が容易に起こると予想される。

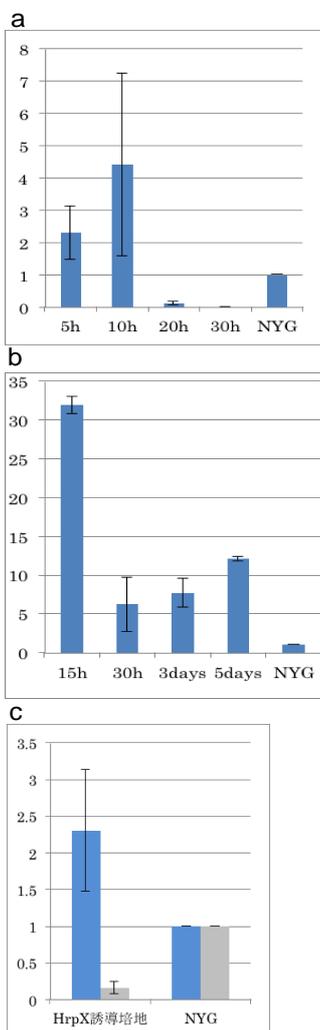


図 7 xcv2724 の発現解析. a, hrp 誘導培地での発現解析. b, 接種植物体 (Micro-Tom) での発現解析. c, hrpX 破壊株を用いた発現解析. 青色: 野生株, 灰色: hrpX 破壊株.

xcv2728、2729 オペロンは、HrpX により制御されていること、また、xcv2724 も hrp 誘導培地および接種植物体上で発現の誘導が認められていることなどから、これら酵素群は、病原性に関わっている可能性が十分に考えられる。特にエクステンシンは、細胞骨格を担っているため、分解されれば、細胞壁は崩壊し、他の多糖類が露出され、さらに分解が進むことにより、細菌の定着や増殖に有利であると考えられる。

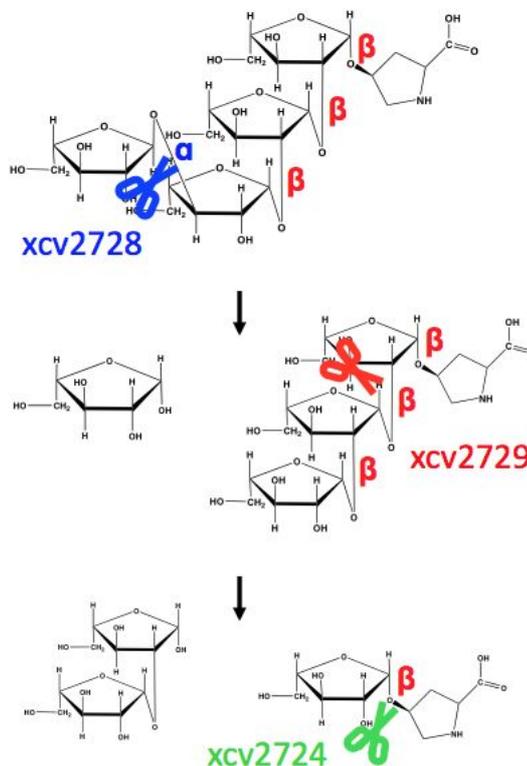


図 8 xcv2724, xcv2728, xcv2729 によるアラビノオリゴ糖鎖の分解の流れ.

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)

[学会発表](計 3 件)

1. 本田 傑・古澤 慧・中村正幸・藤田清貴・岩井 久トマト斑点細菌病菌 (Xcv) UPB139 株由来 GH43 ファミリー -L-アラビノフラノシダーゼ (XcvHypAA) の機能解析 (2016 年 3 月 21~23 日) 日本植物病理学会 全国大会 岡山コンベンションセンター

(岡山県・岡山市)

2. 古澤 慧・中村正幸・藤田清貴・岩井 久

Xanthomonas campestris pv. *campestris*

(Xcc)および*X. campestris* pv.

vesicatoria (Xcv)由来アラビノビオシダ

ーゼ遺伝子(*HypBA2*)の発現解析 (2015年2

月5日)九州病害虫研究会 KKR ホテル熊本

(熊本県・熊本市)

3. 瀧脇玉央・中村正幸・藤田清貴・岩井 久

トマト斑点細菌病菌UPB139株由来 -アラ

ビノオリゴ糖鎖分解酵素群のクローニング

と機能解析(2013年11月13日)日本植物病

理学会九州部会 KKR ホテル熊本 (熊本

県・熊本市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 正幸 (NAKAMURA MASAYUKI)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：90404475

(2)連携研究者

藤田 清貴 (FUJITA KIYOTAKA)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：20381189