

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18380035  
 研究課題名 (和文)  
 植物病原細菌のフラジェリンによる植物免疫の活性化と病原菌によるその回避機構  
 研究課題名 (英文)  
 Mechanisms for the activation and evasion of plant immunity by flagellin from  
 phytopathogenic bacteria  
 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：

植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) の鞭毛構成タンパク質フラジェリンは非宿主植物に対し激しい防御応答 (HR) を誘導するが、宿主タバコには顕著には誘導しない。本研究ではフラジェリン分子中のHR誘導ドメインがアミノ末端側の保存配列 (flg22) に存在することを見出した。また、フラジェリンに結合するラムノースや修飾ビオサミンなどの糖鎖は、鞭毛の安定性を高めた。従って、糖鎖にはflg22の露出を防ぐことで防御応答を回避する機能が推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：分子植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：MAMP, フラジェリン, 糖鎖修飾, ラムノース, キラリティ, ビオサミン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、*Pseudomonas syringae* の鞭毛構成タンパク質フラジェリンは非宿主に対し激しい防御応答 (過敏感反応, HR) を誘導することを見出してきた。*P. syringae* のタバコ病原型細菌 pv. *tabaci* (Pta) のフラジェリンは非宿主ダイズにHRを誘導するが、宿主タバコに対しては顕著な防御応答は誘導しない。一方、*P. syringae* のダイズ病原型細菌 pv. *glycinea* (Pg1) のフラジェリンは、タバコに

対しHRを誘導するが、宿主ダイズに対しては顕著な防御応答を誘導しない。さらに、両フラジェリンの推定アミノ酸配列が同一であること、フラジェリンは糖タンパク質であること、両フラジェリン遺伝子 (*fliC*) を発現ベクターに組み込み、大腸菌で生産させた組換えフラジェリンは糖鎖を持たず、タバコに同様なHRを誘導することが判明し、これらのことよりフラジェリンの有するHR誘導特異性はフラジェリンの糖鎖修飾により決定されているこ

とが推測された。また、フラジェリンのアミノ末端側に保存された22アミノ酸配列からなるペプチドf1g22は、防御応答誘導能を有することが、スイスのBollerにより報告されていたが、f1g22以外の領域に防御応答を誘導する部位があるか否かなどの実験的なデータは乏しい状況であった。

このような背景のもと、本研究では、(1)フラジェリン分子中のHR誘導ドメインの同定、(2)フラジェリンが宿主に対してHRを誘導しないメカニズムの解明、(3)フラジェリンによる防御応答誘導の解析を目的とした。

## 2. 研究の目的

(1)フラジェリン分子中のHR誘導ドメインの同定

フラジェリン分子ではN末端近傍のf1g22が防御応答を誘導することが知られているが、他に防御応答を誘導するドメインは存在しないのかは不明なため、組換えペプチドを用いてHR誘導ドメインを同定する。

(2)フラジェリンが宿主に対してHRを誘導しないメカニズムの解明

PtaとPglのフラジェリンはアミノ酸配列が同一であるのにも関わらず、そのHR誘導特異性は異なっている。この特異性には糖鎖が関わっていると推測されるが、糖鎖修飾機構並びに糖鎖構造は不明である。そこで、f1g22による誘導される防御応答における糖鎖の関与、糖鎖構造、糖鎖修飾機構について解析する。

(3)フラジェリンによる防御応答誘導の解析

フラジェリン処理によって発現が誘導される遺伝子を同定し、それらの機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1)フラジェリン分子中のHR誘導ドメインの同定

フラジェリン遺伝子*flic*を基に、アミノ末端側、カルボキシ末端側、両側、あるいは中央部を欠損させた発現ベクターを構築し、大腸菌を用いて組換えフラジェリンペプチドを

生産する。それぞれのペプチドをシロイヌナズナ葉にインフィルトレートし、カロースの蓄積や細胞死の誘導を観察することにより、フラジェリン中の防御応答誘導ドメインを同定する。

(2)フラジェリンが宿主に対してHRを誘導しないメカニズムの解明

①PtaとPglのフラジェリン糖鎖の構造を解析し、両糖鎖間で異なる構造を見出す。

②糖鎖欠損変異株の鞭毛安定性を形態学的に観察する。

③Pta並びにPglでは*flic*遺伝子上流に2つのフラジェリン糖鎖の修飾に必要な遺伝子(*fgt1*, *fgt2*, 申請時は*orf1*, *orf2*と命名)が存在する。PtaとPglの各Fgt1, Fgt2が異なる糖を転移する可能性を考え、両遺伝子の入換え変異株を作成する。各入換え変異株に由来するフラジェリンのHR誘導能、糖鎖構造を解析する。

④f1g22中のD43が防御応答誘導能に必須のアミノ酸であるとの報告がある。そこで、D43A, D43Vのf1g22ペプチドに加え、変異株由来のフラジェリンを調製し、防御応答誘導能を解析した。また、併せてD43A, D43V変異株の病原性を調査した。

(3)フラジェリンによる防御応答誘導の解析  
フラジェリン応答性遺伝子を同定し、高発現形質転換植物を作成し、病害応答における遺伝子産物の機能を解析する。

## 4. 研究成果

(1)フラジェリン分子中のHR誘導ドメインの同定

フラジェリンタンパク質のアミノ末端側部分を有する組換えペプチドのみがシロイヌナズナに対して防御応答を誘導した。このことからf1g22以外に防御応答誘導ドメインが存在する可能性は低いと考えられた。しかしながら、糖鎖の関与については不明である。

- (2) フラジェリンが宿主に対してHRを誘導しないメカニズムの解明
- ① PtaとPglのフラジェリン糖鎖は共にラムノースを主成分とすること、Ptaのラムノースは殆どL体であるのに対し、PglのラムノースはL体に加えてD体も混在していることが判明した。また、S201のセリンにはL-ラムノースが2つ結合し、先端にビオサミン誘導体が結合していることが判明した。
- ② 糖鎖欠損変異株の鞭毛は不定形を示し、運動能が低下した。これは安定性の低下に起因すると考えられた。
- ③ PtaとPglの間で *fgt1*, *fgt2* を入換えた変異株を作出したが、ラムノースのキラリティに変化は無かった。従って、D-ラムノースを転移する酵素遺伝子は別に存在すると考えられた。また、入換え変異株のHR誘導能についても顕著な変化は無かった。
- ④ flg22のD43A並びにD43Vペプチドは防御応答誘導能を完全に欠損していたことから、D43は防御応答誘導に重要なアミノ酸であることが判明した。一方、D43A, D43V変異株由来のフラジェリンは、防御応答誘導能を維持し、D43に依存しない防御応答誘導ドメインの存在が示唆された。また、D43A, D43V変異株は運動能力と、宿主タバコに対する病原性が著しく低下した。これらのことから、植物は細菌の病原性の維持に必須なアミノ酸配列を認識して防御応答を始動する機構を備えていることが判明した。
- (3) フラジェリンによる防御応答誘導の解析  
フラジェリンをシロイヌナズナに処理すると *WRKY41* 遺伝子の発現が誘導された。そこで *WRKY41* 高発現シロイヌナズナを作出した。本形質転換シロイヌナズナは、半活物寄生性病原細菌である *P. syringae* pv. *tomato* に対する抵抗性が増高するものの、殺生性病原細菌である *Erwinia carotovora* に対する感受性が

高まった。従って、フラジェリン処理によりサリチル酸経路の活性化を伴う防御応答が誘導されたと考えられた。

#### 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 7件)

- ① Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, T., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2008) Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21 (9) 1165-1174.
- ② Hossain Md. M., Tani C., Suzuki T., Taguchi F., Ezawa T. and Ichinose Y. (2008) Polyphosphate kinase is essential for swarming motility, tolerance to environmental stresses, and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72 (4-6) 122-127.
- ③ Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2008) Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 279 (3): 303-312.  
<http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/biochemistry/16/>
- ④ Taguchi, F., Shibata, S., Suzuki, T., Ogawa, Y., Aizawa, S., Takeuchi, K. and Ichinose, Y. (2008) Effects of glycosylation on swimming ability and flagella polymorphic transformation of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *J. Bacteriol.* 190 (2) 764-768.

[http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology\\_and\\_immunology/12/](http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology_and_immunology/12/)

- ⑤Naito, K., Ishiga, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2007) N-terminal domain including conserved flg22 is required for flagellin-induced hypersensitive cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Gen. Plant Pathol.* 73 (4) 281-285.  
[http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology\\_and\\_immunology/13/](http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology_and_immunology/13/)
- ⑥Takeuchi, K., Ono, H., Yoshida, M., Ishii, T., Kato, E., Taguchi, F., Miki, R., Murata, K., Kaku, H. and Ichinose, Y. (2007) Flagellin glycans from two pathovars of *Pseudomonas syringae* contain rhamnose in D and L configurations in different ratios and modified 4-amino-4,6-dideoxyglucose. *J. Bacteriol.* 189 (19) 6945-6956.  
[http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology\\_and\\_immunology/6/](http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology_and_immunology/6/)
- ⑦Taguchi, F., Ogawa, Y., Takeuchi, K., Suzuki, T., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2006) A homologue of the 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III gene located in the glycosylation island of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* regulates virulence factors via *N*-acyl homoserine lactone and fatty acid synthesis. *J. Bacteriol.* 188 (24) 8376-8384.  
[http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology\\_and\\_immunology/7/](http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/microbiology_and_immunology/7/)  
[学会発表] (計 38 件)
- ①一瀬勇規: 「*Pseudomonas syringae*の鞭毛を介した植物相互作用の研究 (平成21年度日本植物病理学会学会賞受賞講演)」平

成21年度日本植物病理学会大会 山形2009, 3, 26-28.

- ②田口富美子・一瀬勇規他5名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*におけるフラジェリン糖鎖欠損変異株の諸性質の解析」平成21年度日本植物病理学会大会 山形2009, 3, 26-28.
- ③常見和彦・一瀬勇規他6名「*Pseudomonas syringae*のフラジェリン糖鎖修飾構造とその合成に関わる遺伝子の機能解析 II」平成21年度日本植物病理学会大会 山形2009, 3, 26-28.
- ④Nguyen Chi Linh・一瀬勇規他4名  
‘Analysis of the genes involved in the synthesis of modified 4-amino-4,6-dideoxyglucose in flagellin of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*’ 平成21年度日本植物病理学会大会 山形2009, 3, 26-28.
- ⑤田口富美子・一瀬勇規「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*フラジェリン糖鎖の病原性に及ぼす影響」第82回日本細菌学会年会 名古屋2009. 3. 12-14.
- ⑥常見和彦・一瀬勇規他1名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*ハーピンの病原性における役割」第82回日本細菌学会年会 名古屋2009. 3. 12-14.
- ⑦神田瑛子・一瀬勇規他1名「*Pseudomonas syringae*のべん毛運動モーターと病原性の解析」第82回日本細菌学会年会 名古屋2009. 3. 12-14.
- ⑧Chi, N.L.・一瀬勇規他1名 ‘Analysis of the genes involved in the flagellin glycosylation in *Pseudomonas syringae*’ 第82回日本細菌学会年会 名古屋2009. 3. 12-14.
- ⑨Chi, N.L.・一瀬勇規他5名 ‘Analysis of the genes involved in the synthesis of

- modified 4-amino-4,6-dideoxyglucose in flagellin of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*' 平成20年度日本植物病理学会関西西部会 和歌山 2008. 9. 18-19.
- ⑩常見和彦・一瀬勇規他5名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*の病原性における *hrpZ*遺伝子の役割」平成20年度日本植物病理学会関西西部会 和歌山 2008. 9. 18-19.
- ⑪神田瑛子・一瀬勇規他5名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*の *motA*, *motC*欠損変異株と相補株を用いた運動能と病原性の解析」平成20年度日本植物病理学会関西西部会 和歌山 2008. 9. 18-19.
- ⑫一瀬勇規他9名「*Pseudomonas syringae* の MAMPsと植物応答」平成20年度感染生理談話会 茨城 2008. 8. 7-9.
- ⑬一瀬勇規「細菌べん毛のフラジェリン糖鎖の構造と機能解析」日本細菌学会第2回細菌学・若手コロッセウム, 湘南 2008. 8. 3-5.
- ⑭内藤佳奈・一瀬勇規他5名「タバコ野火病菌べん毛タンパク質フラジェリンの防御応答誘導活性とべん毛機能の解析」平成20年度日本植物病理学会大会 松江 2008, 4, 26-28.
- ⑮常見和彦・一瀬勇規他6名「*Pseudomonas syringae*のフラジェリン糖鎖修飾構造とその合成に関わる遺伝子の機能解析 I」平成20年度日本植物病理学会大会 松江 2008, 4, 26-28.
- ⑯一瀬勇規「植物細菌の感染戦略における鞭毛の運動能と糖鎖修飾」第81回日本細菌学会年会 京都 2008. 3. 24-26.
- ⑰一瀬勇規・竹内香純「植物病原細菌 *Pseudomonas syringae*のべん毛糖タンパク質フラジェリンの糖鎖構造と機能解析」第60回日本細菌学会中国・四国支部総会 岡山 2007. 12. 13-14.
- ⑱内藤佳奈・一瀬勇規他4名「タバコ野火病菌べん毛タンパク質フラジェリンの防御応答誘導活性とべん毛の機能解析」平成19年度日本植物病理学会関西西部会 岐阜 2007. 10. 6-7.
- ⑲田口富美子・一瀬勇規他4名「タバコ野火病菌べん毛タンパク質フラジェリン糖鎖のべん毛構造・運動能における役割」平成19年度日本植物病理学会関西西部会 岐阜 2007. 10. 6-7.
- ⑳内藤佳奈・一瀬勇規他4名「シロイヌナズナによるタバコ野火病菌べん毛タンパク質フラジェリンの認識」平成19年度感染生理談話会 京都 2007. 8. 9-11.
- ㉑常見和彦・一瀬勇規他6名「*Pseudomonas syringae*のフラジェリン糖鎖修飾構造とその合成に関わる遺伝子に関する研究」平成19年度感染生理談話会 京都 2007. 8. 9-11.
- ㉒Md Mijan Hossain・一瀬勇規他1名  
'Inorganic polyphosphate is essential for swarming motility, survival under the environmental stressed conditions and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605' XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, ソレント, Italy 2007. 7. 21-27.
- ㉓一瀬勇規「*Pseudomonas syringae*のMAMPsと植物防御応答の回避機構」玉田シンポジウム(第21回岡山植物病理セミナー) 倉敷 2007. 4. 21.
- ㉔鈿持隆文・一瀬勇規他5名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*におけるモータータンパク質の駆動力と欠損株の病原性」平成19年度日本植物病理学会大会 宇都宮 2007, 3, 28-30
- ㉕東 邦昭・一瀬勇規他4名「フラジェリン

- 誘導性転写因子WRKY41によるシロイヌナズナ病害抵抗性の調節機構」平成19年度日本植物病理学会大会 宇都宮 2007, 3, 28-30
- ▣川本健太郎・一瀬勇規他4名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*における鉄獲得のswarming運動能に与える影響」平成19年度日本植物病理学会大会 宇都宮 2007, 3, 28-30
- ▣常見和彦・一瀬勇規他5名「*Pseudomonas syringae*のフラジェリン糖転移酵素遺伝子の機能解析」平成19年度日本植物病理学会大会 宇都宮 2007, 3, 28-30.
- ▣Y. Ichinose "Role of flagellin glycosylation in elicitor activity and bacterial virulence"明治大学国際シンポジウム "Plant Immunity: From MAMPs/PAMPs Recognition to Gene-for-Gene Resistance" 2007. 3. 12-13. 東京
- ▣Y. ICHINOSE他5名 "Role of Flagellin Glycosylation in Bacterial Virulence" 7th International Conference on *Pseudomonas syringae* Pathovars and related pathogens, Agadir, Morocco, (2006) Nov. 12-16
- ▣釧持隆文・一瀬勇規他3名「*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*のべん毛モーター遺伝子欠損変異株の解析」平成18年度日本植物病理学会関西部会 京都 2006. 10. 28-29.
- ▣東 邦昭・一瀬勇規他3名「シロイヌナズナのフラジェリン誘導性転写因子WRKY41の機能解析」平成18年度日本植物病理学会関西部会 京都 2006. 10. 28-29.
- ▣東 邦昭・一瀬勇規他3名「フラジェリン誘導性転写因子WRKY41の機能解析」平成18年度感染生理談話会 松江 2006. 8. 17-19.
- ▣釧持隆文・一瀬勇規他3名「植物病原細菌におけるべん毛多機能性の解析」平成18年度感染生理談話会 松江 2006. 8. 17-19.
- ▣Y. Ichinose' Masking of elicitor activity of flagellin by pathovar-specific glycosylation in *Pseudomonas syringae* - Bacterial strategy to avoid plant immune response - "The NAIST Symposium "Frontiers in Plant Immunity Research" 奈良生駒 2006. 6. 24.
- ▣浅井秀太・一瀬勇規他3名「タバコ野火病菌の病原性因子の解析及びSwarming特異的に発現が誘導される遺伝子の探索」平成18年度日本植物病理学会大会 札幌 2006. 6. 3-5.
- ▣小川裕二郎・一瀬勇規他3名「タバコ野火病菌の運動能および病原性に及ぼす走化性の影響」平成18年度日本植物病理学会大会 札幌 2006. 6. 3-5.
- ▣竹内香純・一瀬勇規他5名「ダイズ斑点細菌病菌のフラジェリン糖鎖解析」平成18年度日本植物病理学会大会 札幌 2006. 6. 3-5.
- ▣内藤佳奈・一瀬勇規他5名「シロイヌナズナによるタバコ野火病菌鞭毛タンパク質フラジェリンの認識」平成18年度日本植物病理学会大会 札幌 2006. 6. 3-5. [図書] (計 5件)
- ①一瀬勇規他9名(2008) *Pseudomonas syringae* のMAMPsと植物応答. ゲノム情報を活用した植物感染生理学の展望. (石井英夫他編) 日本植物病理学会 (東京) p. 93-102.
- ②Ichinose, Y.他5名 (2008) Role of flagellin glycosylation in bacterial virulence. In *Pseudomonas syringae*

Pathovars and Related Pathogens -  
Identification, Epidemiology and  
Genomics (M. Fatmi et al. eds.)  
Springer p. 167-174.

- ③一瀬勇規 (2007) *Pseudomonas syringae*による植物免疫の活性化とその制御機構, 微生物の病原性と植物の防御応答 (上田一郎編著) (北海道大学出版会 札幌) p. 132-143.
- ④一瀬勇規 (2007) MAMPシグナル伝達機構. 蛋白質 核酸 酵素 増刊号「植物における環境と生物ストレスに対する応答」 (島本 功・篠崎一雄・白須 賢・篠崎和子 編) 53 (6) p. 635-641.
- ⑤一瀬勇規 (2006) 植物の非宿主抵抗性. 化学と生物 44 (8) 556-562.

## 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