

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780039

研究課題名(和文) 宿主特異的毒素による毒素非感受性植物への抵抗反応誘導機構

研究課題名(英文) Effect of host-selective toxin to toxin-insensitive plant

研究代表者

五味 剣二 (GOMI KENJI)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：50511549

研究成果の概要(和文)：本来病原性決定因子としてしか考えられてこなかった、植物病原糸状菌が生成する宿主特異的毒素には、毒素非感受性の非宿主植物においては、病害抵抗性関連遺伝子の発現を誘導する活性があることを明らかとした。また、宿主特異的毒素によって誘導される新たな病害抵抗性関連遺伝子を多数発見し、宿主特異的毒素の毒素作用以外の作用を明らかにし、毒素非感受性植物が宿主特異的毒素をエリシターとして認識している可能性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Host-selective toxins (HSTs) are known to be secondary metabolites with toxicity towards distinct plant genotypes, but the role of the HST in insensitive plants is unknown. I found that mRNA levels of some defense-related genes in response to a strain of *A. alternata* that produces a host-selective toxin (HST) reached a maximum faster than in response to a non-HST strain of *A. alternata* on a HST-insensitive plant. In addition, I found a lot of novel defense-related genes in response to HST on HST-insensitive plant. These results indicate that HST might work as an elicitor to induce the defense response in HST-insensitive plants.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：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：宿主特異的毒素、植物耐病性、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

植物の病害抵抗性機構は、多くの種において分子レベルのモデルが構築されている。しかしながら、カンキツを含む果樹においては、植物病原菌防御応答にかかわるシグナル伝達関連の基礎研究例が極端に少ない。申請者はこれまで、ラフレモンを材料として研究を進め、植物病原糸状菌に対する病害抵抗時に

強く発現している遺伝子群を多数単離している。

更にその研究過程で、ラフレモンに対して病原性を示さない菌株において、宿主特異的毒素生成菌株と非生成菌株の接種時における各種抵抗性遺伝子の挙動を解析したところ、毒素生成菌株接種時に強く、または早く各種抵抗性遺伝子が誘導されることが明ら

かとなった。これまで、宿主特異的毒素は病気を引き起こす際の病原性決定因子として位置づけられていたが、本研究成果は、宿主特異的毒素が病原性を示さない組み合わせのときには、逆に、抵抗性遺伝子発現を強く誘導させる“エリシター様活性”を有する可能性を示すものである。しかしながら菌株が統一されていない、精製した毒素単独処理の場合、処理葉表面に傷を付けないと毒素が作用しないため、各種抵抗性遺伝子発現の傷害誘導が引き起こされて精密な実験ができない等の問題により、宿主特異的毒素の毒素作用以外の作用を正確に結論付けることができていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、毒素生産菌株から作製した毒素欠損株を用いて菌株を統一することにより、宿主特異的毒素の病原性決定因子以外の役割を正確に解明することを目的とし、宿主特異的毒素のエリシター活性や、宿主特異的毒素に反応し、発現が誘導される遺伝子の解明をする。

3. 研究の方法

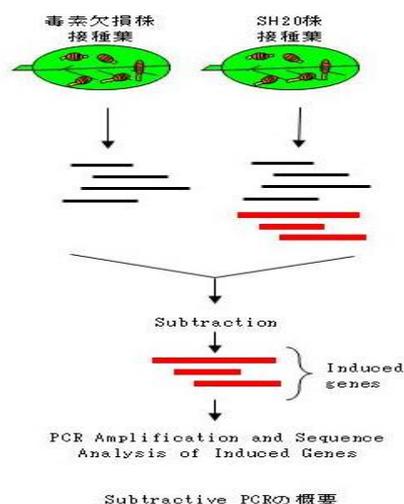
ラフレモンに対して病原性を示さないが宿主特異的 ACT 毒素を産生する *Alternaria alternata* tangerine pathotype SH20 菌株を使用し、ラフレモン - SH20 菌株の“不親和な組み合わせ”を基盤に、SH20 菌株から作製した毒素欠損株を用いて以下の2点の実験を行い宿主特異的毒素の不親和な組み合わせ時の作用を検証した。

(1) 宿主特異的毒素の非感受性植物における作用解析

毒素単独処理や、ラフレモン葉に SH20 菌株と、毒素生合成能欠損 SH20 菌株を接種した時の病害抵抗性関連遺伝子の発現挙動を、ノーザンブロットにより検証することによって、宿主特異的毒素の抵抗性関連遺伝子の発現に対する影響を検証した。

(2) 宿主特異的 ACT 毒素によって発現が誘導される新規遺伝子群の探索

これまで、宿主特異的毒素非感受性植物において、宿主特異的毒素に反応する遺伝子の存在は全く調べられていない。そこで、宿主特異的毒素によって誘導される新規遺伝子を特定するため、SH20 菌株を接種したラフレモン葉から調整した RNA と、毒素生合成能欠損 SH20 菌株を接種したラフレモン葉から調整した RNA を用いて、Subtractive PCR 法 (右上図) を行い、SH20 菌株接種時に発現が強い遺伝子を網羅的に解析した。また、この解析によって、これまでに明らかとされなかったカンキツ病害抵抗性に重要な新規遺伝子を探索した。



4. 研究成果

(1) 宿主特異的毒素の非感受性植物における作用解析

① 精製した宿主特異的毒素単独処理の検証

ACT毒素単独処理の条件を検討するため、ACT毒素粗抽出画分を感受性品種であるイヨの葉の葉柄に滴下処理し、経時的観察を行った。その結果、毒素による壊死は引き起こせるものの、その度合いが処理葉によってばらばらであったため、遺伝子発現の挙動を解析するための条件としては適さないと判断し、毒素生成菌株と非生成菌株の孢子接種での解析が最適であると結論付けた。

② マーカー遺伝子の選定

宿主特異的毒素のエリシター効果を検証するためには、指標とする病害抵抗性関連遺伝子の選定が必須である。申請時は6種類の遺伝子しか検証していなかったため、平成21年度にこれまでに当研究室で蓄積してきた22種類のカンキツ病害抵抗性関連遺伝子を用いて、ACT毒素生成菌と非生成菌をラフレモン葉に接種した時における発現挙動の差異を解析した。その結果、16種類の遺伝子の発現において、毒素非生成菌接種時と比べて差異が認められた。16種類のうち、再現性の高かった、リポキシゲナーゼ (*LOX*)、アレノキシドシンターゼ (*AOS*)、ヒドロペルオキシドリアーゼ (*HPL*)、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (*PAL*)、カルコンシンターゼ (*CHS*)、酸性キチナーゼ (*ACH1*)、塩基性キチナーゼ (*BCH1*)、エポキシドヒドロラーゼ (*EH*) の遺伝子挙動の結果を図1に示す。また、その発現挙動パターンには以下の3タイプがあることが明らかとなった。

(タイプ1) 接種後、発現量が最大になるまでの時間が短い遺伝子; *LOX*、*AOS*、*HPL*、*BCH1*、*EH*

(タイプ2) 誘導されるまでの時間は変わらないが誘導される発現量が多い遺伝子; *ACHI*

(タイプ3) 最大発現量やその時間にそれほど差異はないが、長時間発現誘導されている遺伝子; *PAL*, *CHS*

さらに、本解析はシグナル伝達経路の上流遺伝子、下流遺伝子の両方を用いて行ったが、どちらの遺伝子群において差異が認められたため、ACT毒素にはかなり広範なエリシター作用がある可能性が示された。

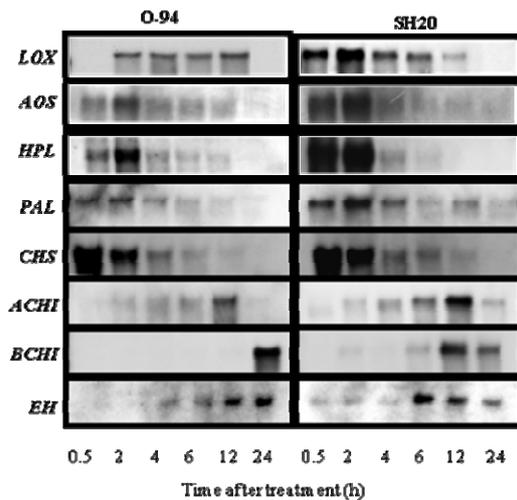


図1 ラフレモン葉に宿主特異的毒素生成菌 (SH20) と非生成菌 (O-94) を接種した時の病害抵抗性関連遺伝子の挙動解析

③毒素欠損変異株接種時における病害抵抗性関連遺伝子の発現挙動解析

宿主特異的毒素のエリシター効果を正確に検証するため、平成21年度に選定した16種類の病害抵抗性関連遺伝子マーカーの内、最も反応性が高いことが予想された5種類の遺伝子 (*LOX*, *HPL*, *ACHI*, *BCHI*, *EH*) を用いて、ACT毒素生成菌株と毒素欠損変異株を不親和の組み合わせのラフレモン葉に接種した時における発現挙動の差異を解析した。その結果、4種類の遺伝子 (*LOX*, *HPL*, *BCHI*, *EH*) で、ACT毒素生成菌株接種時の方が発現量が短時間で最大、または、発現量が毒素欠損変異株接種時よりも多いという結果が得られた。残りの *ACHI* 遺伝子においては、毒素欠損変異株接種時の方が強く発現誘導がかかるということが明らかとなり、毒素非生成菌接種時と異なる結果が得られた (図2)。これらのことから、宿主特異的毒素が不親和の組み合わせ時においては、多くの病害抵抗性関連遺伝子の発現を誘導する活性があることが判明した。さらに、宿主特異的毒素によって発現が抑制される遺伝子が存在することも明らかとなり、宿主特異的

毒素のサブレッサー活性の可能性も見出せた。以上のことより、職種特異的毒素が非感受性植物においても認識されている可能性が高いことが示された。

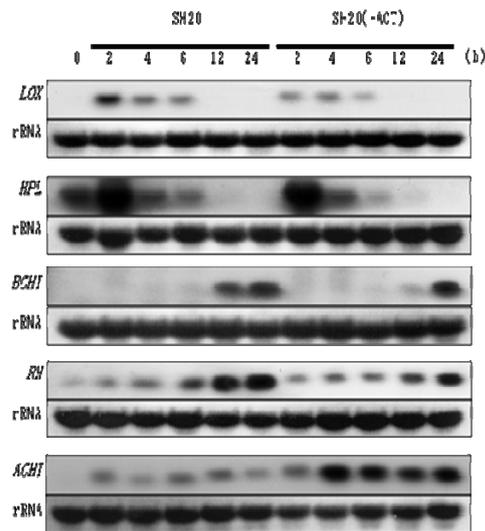


図2 ラフレモン葉に宿主特異的ACT毒素生成菌株 (SH20) と毒素欠損株 (SH20-ACT) を接種した時の病害抵抗性関連遺伝子の挙動解析

(2) 宿主特異的ACT毒素によって発現が誘導される新規遺伝子群の探索

宿主特異的ACT毒素によって、マーカー遺伝子の発現挙動が変化することが明らかとなり、毒素非感受性植物において、宿主特異的毒素には、遺伝子発現を誘導または抑制する活性があるということが明らかとなった。そこで、宿主特異的毒素によって誘導される新規遺伝子を特定するため、SH20菌株を接種2時間後のラフレモン葉から調整したRNAと、毒素生合成能欠損SH20菌株を接種2時間後のラフレモン葉から調整したRNAを用いて、Subtractive PCR法を行い、SH20菌株接種時に発現が強い遺伝子を網羅的に解析した。サブトラクション後、PCRで増幅した遺伝子断片をベクターにライゲーションし、大腸菌に形質転換することでクローンを得た。得られた500クローンをシーケンス解析し非特異的な配列を持つクローン除いた結果、133個のクローンが得られた。各クローンの塩基配列を用いて相同性検索したところ、62クローンが機能既知の各遺伝子と相同性を持つことが明らかとなり、71クローンが機能未知という結果となった。機能既知の遺伝子のうち、既に病害抵抗性に関与することが報告されている遺伝子を含む一覧を表1にまとめた。表1の赤字で示した *LOX*, *HPL* は先のノー

表1 宿主特異的ACT毒素によって発現誘導される遺伝子一覧（病害抵抗性に関与すると思われる遺伝子）

| Clone No | BLASTn検索結果 |
|----------|--|
| 370 | terpene synthase |
| 498 | maturase K |
| 23 | RING-H2 finger protein |
| 29 | callose synthase 10 |
| 52 | putative DNA binding protein |
| 73 | -germacrene D synthase |
| 118 | virus resistance gene (transposaseE) |
| 126 | hydroperoxide lyase(R1emHPL) |
| 128 | lipoxygenase (R1emLOX) |
| 175 | lipoxygenase |
| 178 | virus resistance gene retrotransposon C |
| 197 | RING-H2 finger protein |
| 221 | class III chitinase |
| 243 | HECT ubiquitin-protein ligase 3 |
| 246 | citrus tristeza virus resistance gene |
| 348 | WRKY transcription factor |
| 460 | hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase |
| 500 | WRKY transcription factor |
| | Unknown× 71 |

ザンプロットで使用したマーカー遺伝子で、SH20株接種時に強く発現誘導されることが既に明らかとなっているため（図2）、今回の Subtractive PCR 実験において本遺伝子が単離されたことは、実験の信頼性の高さを示すものである。今回得られた遺伝子の一部と、新たに調整したRNAを用いて再現性を確認したところ、図3に示したように再現性が得られたことから、これら遺伝子群が宿主特異的ACT毒素反応遺伝子である可能性が高いと判断した。

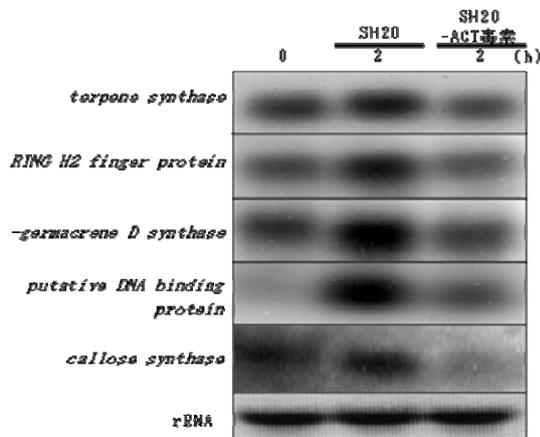


図3 Subtractive PCR によって得られた遺伝子の再現性の確認

これら遺伝子の中には、近年当研究室の研究で明らかとされ、カンキツ病害抵抗性機構に重要な役割を持っていることが示唆されている植物揮発性モノテルペンを合成する酵素遺伝子（表1クローン番号370）が含まれていた。カンキツは多くの揮発性モノテルペンを放出するが、それぞれを合成する酵素遺伝子は、ラフレモンにおいてはこれまで

2つしか単離されてきていない。今回の研究により、新たなモノテルペン合成酵素遺伝子が単離されたことは、今後のカンキツ病害抵抗性機構における揮発性モノテルペンの役割の解明に大きく貢献すると思われる。今回の実験で単離されてきた他のクローン一覧を表2にまとめた。

表2 宿主特異的ACT毒素によって発現誘導される遺伝子一覧（その他）

| Clone No | BLASTn検索結果 |
|----------|--|
| 15 | aquaporin |
| 20 | myo-inositol-1-phosphate synthase |
| 28 | triosphosphate isomerase-like protein type I |
| 60 | aspartate kinase |
| 66 | catalase |
| 70 | geranylgeranyl reductase |
| 86 | maturase K |
| 96 | tRNA-Ala (tmA) gene |
| 102 | putative GTP pyrophosphokinase |
| 104 | serine/threonine kinase |
| 108 | myosin heavy chain kinase |
| 121 | dihydrofolate reductase-thymidylate synthase |
| 129 | myo-inositol-1-phosphate synthase |
| 140 | beta-amylase |
| 147 | starch branching enzyme |
| 154 | glycine-rich protein |
| 180 | glutamate receptor protein GLR3.4b |
| 211 | alternative oxidase |
| 228 | ATPase subunit 8 |
| 230 | myo-inositol-1-phosphate synthase |
| 241 | ribosomal protein L2 |
| 256 | putative glyoxylate pathway regulator |

| Clone No | BLASTn検索結果 |
|----------|---|
| 257 | Glycine max grr1 |
| 266 | rhodanese-like protein |
| 267 | RNA polymerase beta subunit |
| 277 | RNA polymerase alpha subunit protein |
| 289 | lectin-related protein precursor |
| 290 | myo-inositol-1-phosphate synthase |
| 292 | maturase K |
| 294 | dynamine-like protein |
| 295 | photosystem1 subunit A |
| 308 | aquaporin |
| 324 | HSP90-2 |
| 343 | IN01 |
| 354 | myo-inositol-1-phosphate synthase |
| 372 | Aquaporin |
| 386 | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit |
| 394 | ribosomal protein |
| 416 | alpha-expansin |
| 420 | api2 |
| 454 | maturase K |
| 456 | proline-rich protein |
| 481 | serine/threonine kinase |
| 470 | poly(A)-binding protein |

これらの結果から、宿主特異的毒素によって様々な遺伝子の発現が誘導されており、植物体内で様々なシグナル伝達機構が発動していることが明らかとなり、宿主特異的毒素の影響が多岐にわたっている可能性が示唆された。

以上のことから、本研究成果は、宿主特異的毒素の病原性決定因子以外の役割を明らかにすると共に、植物-微生物間相互作用時

において、植物側は相互作用する相手の生物を特定するために、様々な物質を認識するシステムを有していることを明らかとしたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① 西村聡、古閑篤史、衣川勝、山崎祐美子、加藤寛、片岡郁雄、五味剣二、秋光和也、*Actinidia arguta* リボキシゲナーゼ遺伝子 cDNA の単離、日本植物病理学会報、査読有、75巻、2009、112-115

〔学会発表〕(計12件)

- ① 宍戸穂高、宿主特異的毒素の病害抵抗時における役割、植物病理学会、2011年3月27日、東京農工大学(東京)
- ② 溝淵優希、ACT 毒素生合成遺伝子クラスターが座乗する染色体と AF 毒素生合成クラスターが座乗する染色体中の共通領域について、植物病理学会、2011年3月27日、東京農工大学(東京)
- ③ 和泉悠利子、宿主特異的 ACR 毒素を生産する *Alternaria alternata* ラフレモン系統が特異的に保有するポリケチド合成酵素遺伝子の解析、2011年3月27日、東京農工大学(東京)
- ④ 安田晋輔、yeast-two-hybrid 法により選抜した *ACRS* mRNA 結合タンパク質 (AmBP30) と相互作用するタンパク質について、2011年3月27日、東京農工大学(東京)
- ⑤ 馬越史奈、ascorbate peroxidase をコードするラフレモン抵抗性関連遺伝子 (*RlemAPXI*) の機能性解析、2011年3月27日、東京農工大学(東京)
- ⑥ 宍戸穂高、宿主特異的毒素の病害抵抗時における役割、植物病理学会関西部会、2010年9月30日、AOSSA(福井)
- ⑦ 和泉悠利子、宿主特異的 ACR 毒素を生産する *Alternaria alternata* ラフレモン系統の生合成を担う遺伝子群の解析、2010年9月30日、AOSSA(福井)
- ⑧ 和泉悠利子、RNA サイレンシングと標的遺伝子破壊法を用いた *ACRTS1* の遺伝子宿主特異的 ACR 毒素生産における役割検定、2010年4月18日、京都国際会議場(京都)
- ⑨ 安田晋輔、Screening of component proteins in *ACRS* mRNA binding protein (AmBP30) complex using yeast two-hybrid system、KSPP Fall Meeting and the 1stJapan-Korea Joint

Symposium、2009年10月28日、KAL hotel(韓国)

- ⑩ 和泉悠利子、Role of pathotype-specific *ACRTS1* gene for the biosynthesis of host-selective ACR-toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*、KSPP Fall Meeting and the 1stJapan-Korea Joint Symposium、2009年10月28日、KAL hotel(韓国)
- ⑪ 安田晋輔、*ACRS* mRNA 結合タンパク (AmBP30) 複合体構成タンパクの yeast two-hybrid 法によるスクリーニング、植物病理学会関西部会、2009年10月17日、神戸大学(兵庫)
- ⑫ 和泉悠利子、宿主特異的 ACR 毒素生産菌株に特異的に座乗する *ACRTS1* 遺伝子の ACR 毒素生合成における役割、植物病理学会関西部会、2009年10月17日、神戸大学(兵庫)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/plantpathology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 剣二 (GOMI KENJI)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：50511549