

## 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23年 5月10日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380029

研究課題名（和文）非病原力因子のサプレッサー機能抑制による病害耐性植物の創出

研究課題名（英文）Construction of disease-resistant plants by controlling the suppressor function of avirulence effector

研究代表者

露無 慎二（TSUYUMU SHINJI）

静岡大学・農学部・特任教授

研究者番号：30090541

研究成果の概要（和文）：

品種特異的抵抗反応を誘導する非病原力エフェクターが同時にサプレッサー機能をも有するが、カンキツかいよう病菌の非病原力様でかいよう形成を司るエフェクター、PthA、もサプレッサー機能も持つ。我々は、PthA エフェクターが宿主植物であるカンキツの Pectin Methyl Esterase (PME) 前駆体に特異的に結合することを発見した。このことから、PthA と結合出来ない他植物の PME 前駆体遺伝子の導入、カンキツ PME 前駆体遺伝子への変異導入などによってこの結合をコントロールし、かいよう形成カスケードに導かないようにできる可能性を示すことができた。さらに、非病原力エフェクターと反応する植物因子を改変し、非病原力エフェクターのサプレッサー機能抑制することにより耐病性植物創出に導く可能性を示唆出来た。

研究成果の概要（英文）：

We had found that avirulence factors possess the suppressor function in addition to the common eliciting function of cultivar-specific resistance responses. PthA, a canker-forming effector with homology to the avirulence effector (AvrBs3) group commonly found in xanthomonads, was found to possess the suppressor function too. Here we found that PthA can bind specifically to the precursor for pectin methyl esterase (PME) of Citrus led to the new strategy to create the canker-resistant Citrus by the introduction of the PME precursors of other plant sources together with the introduction of mutation into the citrus PME precursor or gene silencing of PME precursor gene of Citrus by RNA interference. We suggest this modification of the suppressor activities of avirulence effectors by modification of their binding protein in the host plants as a new strategy for the construction of disease-resistant plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
平成23年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
平成24年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：カンキツかいよう病菌、PthA エフェクター、Pectin methyl esterase 前駆体、RIN4、UPA ボックス、非病原力遺伝子、AvrBs3 ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

植物病原菌の非病原力遺伝子は品種特異的抵抗性反応を誘導することで知られているが、我々はこれが条件によっては全く逆の抵抗性反応誘導抑制（サブレッサー）作用をもつことを発見していた（*avr* 遺伝子二元説）。カンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac) は、*xanthomonads* に広く分布する非病原力遺伝子 *avrBs3* 遺伝子ファミリーと90%以上の高い相同性を示しながら、その翻訳産物がカンキツ内では主要な病原性因子（かいよう形成を司る）として作用する *pthA* 遺伝子を持っている。カンキツかいよう病菌において、*pthA* 遺伝子は本来抵抗性誘導を司る遺伝子であったと考えられるが、カンキツ植物内でおそらく植物成分と相互反応し、抵抗性誘導能力を失い、その結果病原性発現に向かったと考えられた。実際、我々はカンキツ細胞タンパク質であるペクチンメチルエステラーゼ (Pectin methyl esterase, PME) 前駆体が PthA エフェクターと結合することを見いだしていた。このことから、カンキツでサブレッサー機能を抑制することによってかいよう病耐性を付与することができると考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の発見から、カンキツかいよう病菌の PthA エフェクターとカンキツ PME 前駆体の結合をコントロールすることによって、植物の抵抗性反応を抑制して発病に導けなくすることにより、抵抗性に導くことができると考えた。すなわち、カンキツ内での PME 前駆体の発現を RNA 干渉によって抑制したり、突然変異の導入により PthA エフェクターとの結合を変化させたりする作業と、PthA エフェクターと結合しない他の植物の前駆体 PME を発現させる準備作業を組み合わせ、カンキツかいよう病抵抗性植物を作出する。なお、供試した殆どの非病原力遺伝子が二つの異なる作用（抵抗性誘導と病原性発現）を有することを発見しており、カンキツかいよう病耐性獲得のための戦略を用いることによって、広範な植物に病害抵抗性を付与することを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) PthA エフェクターとカンキツ PME 前駆体との結合様式を調べるため、PME 前駆体の N 末端側または C 末端側に蛍光標識タンパク質 (DsRed 或は GFP) と、対応する蛍光タンパク質で標識した PthA をタマネギ鱗片細胞内にエレクトロポレーションによって導入して発現させ、共焦点レーザー顕微鏡の緑色、赤色、それらの混合（黄色）領域で像を観察

し、両因子の結合の有無、局在部位を調べた。

(2) PthA エフェクターやその他の AvrXa3 ファミリー因子と、各植物の PME、そして他の非病原力因子と第三の因子として結合する RIN4 との結合体形成を生体分子間相互作用検出器 (AffinixQ) で解析した。

(3) (2) の単独、結合タンパク質の植物遺伝子のプロモーター領域への結合をゲルシフトアッセイによって解析し、植物遺伝子発現制御の可能性を調べた。

(4) 我々はカンキツかいよう形成に際してテロメラーゼ (*TERT*) 遺伝子が増高することを見いだしていたが、本遺伝子の発現を RNA 干渉によって抑制することがかいよう形成に与える影響について調べた。

## 4. 研究成果

(1) PthA エフェクターがプロセッシングを受ける事を見つけた。このことより、このプロセッシングも PME 前駆体との結合に影響を与える可能性が示唆された。

(2) カンキツのかいよう形成の際、カンキツのテロメラーゼの生産誘導が必要であることを *TERT* 遺伝子のジーンサイレンシングコンストラクトを用いて明らかにした。また、このことより、カンキツにおけるジーンサイレンシング実験系を確立することが出来た。

(3) カンキツかいよう形成の際、かいよう形成の際みられる細胞肥大を司るインドール酢酸合成系の遺伝子が誘導される事を確認し、かいよう形成機構の一端を解明した。

(4) ピーマン斑点細菌病菌の *avrBs3*, イネ白葉枯れ病菌の *avrXa7*, *avrXa10* 等の非病原力遺伝子と、同じ *avrBs3* 遺伝子ファミリーに属し、互いに90%以上の相同性を示しながらカンキツかいよう形成を司る *pthA* 遺伝子との間で、また、これらの遺伝子のキメラコンストラクトについて、非病原性 Xac 変異株形質転換体を用いたカンキツ葉接種後の病原性、タバコ葉接種後の過敏感反応誘導能について調べた。その結果、AvrBs3 エフェクターファミリーに共通して中央部に見られる繰り返し部がそれぞれの特異性決定に重要な役割を果たすが、また、その直後の領域も特異性決定に関与する事がわかった。

(5) *Xanthomonas* 属細菌の多くが生産する AvrBs3 エフェクターファミリーのうち宿主、役割の異なる AvrXa3, AvrXa10, AvrXa7, Apl1 が共通してピーマンの抵抗性遺伝子 *RBs3* のプロモーター領域に存在する *upaBox* に結合する事をゲルシフトアッセイによって確認した。これにより、Avr エフェクターとプロモーター領域の結合が第三の因子によって決定される事が示唆された。

(6) カンキツ内の PthA エフェクター結合分子が PME 前駆体であること、また PthA との結合が前駆体 PME のプロセッシングをコントロールしていること、PthA がタバコ、トマトの PME 前駆体とは結合しない事が共焦点顕微鏡を用いたオニオン細胞内の局在性解析から分かった (図 1)。

図 1

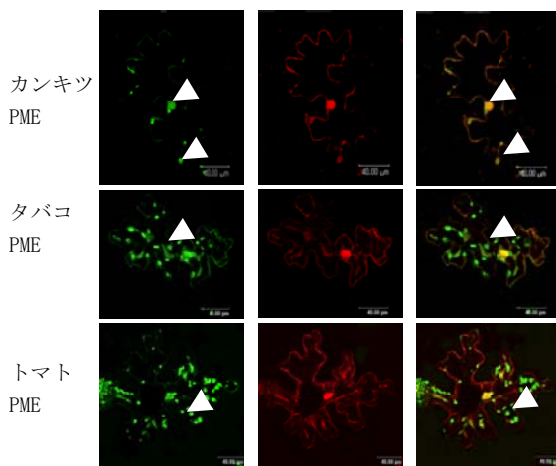


図 1. *Apl1* とトマト、タバコの前駆体 PME を植物細胞内で共発現させた時の局在性。カンキツ PME と PthA を共発現させたときは、核など同じところに局在しているのが観察され、カンキツ PME 単独、または *Apl1* 単独で発現させたときの局在と異なっていた。しかし、トマト PME あるいはタバコ PME と PthA のそれぞれを共発現させたときは、トマトあるいはタバコ PME は主に単独で発現させたときと同じような粒状のタンパクが観察され共局在したタンパクの存在は観察されなかった。このことから *Apl1* は植物細胞内においてカンキツ PME と特異的に結合している可能性が示唆された。

(7) カンキツ PME 前駆体が多くの植物病原細菌の非病原因子で第三の結合因子として報告されている RIN4 とも結合する事が分かった。これらの事から、PthA が前駆体 PME と RIN4 の双方と、どのように結合するかによって、上記 UPA ボックスへの結合性、転写量がコントロールされる事が予想された。従って、カンキツかいよう病耐性植物の作出する標的分子として、前駆体 PME の他に RIN4 も加えることができる事が示唆された。

(8) ゲルシフト解析の結果、AvrBs3, PthA, *Apl2*, *Apl3*, AvrXa7, AvrXa10 は、いずれも *upa* Box に結合した。しかし、その結合力には違いが見られた。この他の結果から、AvrBs 3 エフェクター共通して、単独でプロモータ

ーに結合することが出来るが、PME 及び RIN4 の結合の特異性を支配していると考えられた。

(9) カンキツ PME 前駆体のプロセッシングは、カンキツかいよう病菌の PthA との結合によってコントロールされることを蛍光標識タンパク質の共焦点レーザー顕微鏡観察で明らかにした。

(10) *LrpX* が *hrpG* の転写をコントロールしており、実際 *hrpG* のプロモーター量いに *LrpX* が結合することをゲルシフトアッセイにより示した。

(11) カンキツかいよう病菌が、植物のシグナルを *XAC4131* 遺伝子産物がセンサーとして感知し、シグマ因子 RpoE を活性化する *XAC4130* 遺伝子産物を介して、主要な *hrp* オペロン制御遺伝子である *hrpG* と *hrpX* を制御するカスケードを発見した。これらの複雑な制御の解明により、*hrp* オペロンの誘導を抑えてタイプ III 分泌機構形成を抑制し、発病に導くエフェクターの植物細胞内への注入を抑える戦略も耐病性植物の作出の可能性を示唆した。

## 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 6 件)

1. Tsuyumu, S. and S. Tsuyumu, Molecular Biological and Nano-technological studies on postharvest diseases. *Acta Horticult.* **973**: 31-34 (2013) (査読有り)
2. Srepon, K., P. Jitareerat, A. Uthairatanaki, V. Srilaong, C. Wongs-Aree, and S. Tsuyumu, Induction of defense mechanisms on harvested mangoes by UV-C irradiation. *Acta Horticult.* **973**: 89-95 (2013) (査読有り)
3. Amy Charkowski, Carlos Blanco,, Shinji Tsuyumu, ,, and Iris Yedidia, The role of secretion system and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. *Ann. Rev. Phytopathol.* **50**:425-4249 (2012) (査読有り)
4. M.M. Haque, H. Hirata and S. Tsuyumu, Role of PhoP-PhoQ two-component system in pellicle formation, virulence and survival in harsh environments of *Dickeya dadantii* 3937. *J. Gen. Plant Pathol.* **78** : 5409-5418 (2012) (査読有り)
5. Y. Lu, H. Hirata, and S. Tsuyum, KdgR, an ICIR family transcriptional regulator, inhibits virulence mainly by repression of

*hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.  
*J. Bacteriol.* **193 (23)** : 6674-6682 (2011) (査読有り)

6. Jeremy D. Glasner, C-H. Yang,, S. Tsuyumu, ,, and Nicole T. Perna. Genome Sequence of the Plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. *J. Bacteriol.* **193 (8)**: 2076-2077 (2011) (査読有り)

[学会発表] (計7件)

- (1) 石山佳幸、松倉藍、友松ゆい、平田久笑、露無慎二、宿主 *TERT* 遺伝子のサイレンシングがカンキツかいよう病菌の増殖に及ぼす影響、日本植物病理学会関西部会 (福井市) 平成22年9月30日
- (2) 山本秀彦、平田久笑、露無慎二、軟腐グループ細菌のフラジェリンによるタバコ抵抗反応の誘導レベ、日本植物病理学会関西部会 (福井市) 平成22年9月30日
- (3) Tsuyumu, S., Tri Joko, T. Murata and H. Hirata, Molecular Biological and Nano-Technological studies on postharvest diseases. International Conference on Postharvest Pest & Disease Managements in exploiting for Horticultural crops, at Bangkok, Thailand Feb. 22, 2012

[図書] (計1件)

1. S. Tsuyumu, et al., and H. Hirata, Pathogenicity determinant of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causative agent of citrus canker. In "Genome-enabled analysis of plant-pathogen interactions." Eds. T. Wolpert et al, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 225-230. (2011)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

露無 慎二 (TSUYUMU SHINJI)  
静岡大学・農学部・特任教授  
研究者番号 : 30090541

### (2) 研究分担者

平田 久笑 (HIRATA HISAE)  
静岡大学・農学部・准教授  
研究者番号 : 00432196

### (3) 連携研究者

なし