

カンキツかいよう病制圧に向けての分子生物学的戦略

静岡大学農学部植物病理学研究室 ^{つゆ} 露 ^む 無 ^{しん} 慎 ^じ 二

はじめに

一般に、植物細菌病の薬剤散布による防除は難しい。これは病原細菌の増殖場所がたいていの場合、細胞間隙にあるためといわれている。したがって、薬剤散布は、病原細菌の宿主植物への侵入前でしか通常有効ではない。したがって、細菌病を制圧するためには、薬剤散布以外の方法で、植物組織内における病原細菌と宿主植物との相互作用の時期も抑えるようにしなければならない。このためには、病原細菌と宿主植物の相互作用における標的について十分な情報が必要である。これらの情報が得られれば、植物の遺伝子操作技術が近年発達しているので、異種生物の遺伝子を導入したり、本来持つ遺伝子を改変したりすることにより、植物体内における病原細菌の活動を抑えることができる。

最近、カンキツかいよう病菌では、植物細胞核内へ移行する全く新しいタイプの発病因子が発見され、カンキツ体内でのこの因子の生産、分泌、さらには病徴発現までの一連の過程が明らかになってきており、細菌病制圧に向けて研究するモデル系として注目されている。我々の研究室もこのような考えで、この因子について種々角度から検討を行っている。本稿では、まず、この因子がどのような構造をしており、どのように植物核内に移行し、どのようにかいようを形成するようになるのかについて、現在までに明らかにされている情報を紹介し、次に、これらの情報を基にカンキツかいよう病制圧のための戦略について私見を述べる。

I かいよう形成機構

1 かいよう形成因子の構造

かいよう形成因子は、*Xanthomonas* 属細菌のレース特異性決定に関与する多くの非病原力遺伝子 (*avr*) と相同性を示す遺伝子 (*pthA*) として発見された (SWARUP et al., 1991)。これらの遺伝子 (*avrBs3* ファミリーと呼ばれている) は互いに高い相同性を示すばかりでなく、中央部に 102 塩基を 1 単位とした 15~30 個の

繰り返し配列を持つことで共通している (図-1)。したがって、この遺伝子の翻訳産物では、中央部に 33 個のアミノ酸からなるペプチドがタンデムに並ぶことになる。明確なレース分化が見られないカンキツかいよう病菌で、*avr* 遺伝子と相同性を示す遺伝子が存在するのは不思議な話であるが、本遺伝子をカンキツの弱病原性細菌である *Xanthomonas citrumello* 等に導入すると、かいよう症状を形成するようになる。したがって、かいよう病菌 *pthA* 遺伝子は、非親と関係にある植物における抵抗性反応をつかさどる *avr* 遺伝子とは異なり、親と関係にある宿主植物における病原性発現をつかさどる。

カンキツかいよう病菌には、*pthA* 相同領域が複数 (L9 株では三個) 存在し、これらはいずれもプラスミド上に存在する (TSUYUMU et al., 1996)。L9 株では、この内一つのみが完全なかいよう形成能を持っており、残りは、全く持たないか、不完全にしか持たないものであった。これら三領域の DNA 塩基配列を調べてみると、上記遺伝子内繰り返し配列部において若干の違いが見られただけで、それ以外の翻訳領域や、翻訳領域上流 247 塩基までの領域と下流 111 塩基までの領域の塩基配列が完全に一致していた。しかも、これらの両端は逆向きの繰り返し配列になっており、この領域全体が動く因子として機能していることが示唆された (KANAMORI and TSUYUMU, 1998)。なお、繰り返し部のみの違いによって、かいよう形成能を持ったり、持たなかったりするわけであるから、この繰り返し部はかいよう形成に必須な領域であると考えられる。また、このように相同性の高い領域が同一細胞内に複数存在していることから予想されることであるが、相同組換えによって繰り返し配列部が容易に変化することが確認されている。

その他の構造上の特徴としては、繰り返し配列部に続いてロイシンジッパーと核局在性配列 (図 1) が存在する。ロイシンジッパーはタンパク質-タンパク質相互作用に関与する可能性を示唆しており、核局在性配列は植物細胞核内へ移行することを示唆している。後述する



図-1 *Xanthomonas* 属細菌の *avrBs3* 遺伝子ファミリーの共通構造

LZ: ロイシンジッパー、NLS: 核局在性配列。

Molecular Biological Strategies toward Control of Citrus Canker Disease. By Shinji TSUYUMU

(キーワード: カンキツかいよう病, かいよう形成因子, 核局在性配列, タイプ III 分泌機構, かいよう病耐性形質転換体植物)

が、種々解析によって、これらの配列が予想された機能を持ち、病徴発現に不可欠であることが立証されている。

2 かいよう形成因子の分泌

かいよう形成因子 (*pthA* 翻訳産物) には、シグナルペプチドが見られないので、一般的な菌体外タンパク質の分泌機構とは異なる機構で分泌されるようである。*pthA* 遺伝子を持つプラスミドとタイプ III 分泌機構 (図-2) をつかさどる *hrp* クラスターを持つプラスミドの両方を大腸菌に持たせると、この大腸菌はカンキツにかいよう様症状を呈するようになる (投稿中)。また、かいよう病菌の *hrp* 遺伝子欠損変異株はかいよう症状を呈することができない。これらのことから、このかいよう形成因子はタイプ III 分泌機構によってかいよう病菌の内膜と外膜を一気に通過する必要があると考えられる。さらに、少なくとも一部の植物病原細菌では、タイプ III 分泌機構の出口は線毛となって突出していることが発見されている。かいよう形成因子は以下に述べるごとく、植物細胞内へ移行するので、孔を持つ線毛は本因子を植物細胞内に注入するうえで便利な構造かもしれない。

3 かいよう形成因子の植物細胞核への移行

先に、かいよう形成因子には核局在性配列が存在することを述べた。*pthA* 遺伝子の核局在性配列コード部の上流領域を除き、レポーター遺伝子 *gus* を組み入れた融合体を植物細胞内に導入すると、GUS 活性は植物細胞核内のみに観察される。しかし、同じシステムで、核局在性配列に部位指定変異作成法により変異を導入する

と、GUS 活性は細胞質内全体に広がってしまうようになる (YANG and GABRIEL, 1995)。このことから、かいよう形成因子の核局在性配列は自身が核に移行するために機能していることがわかる。なお、*pthA* が *avrBs3* 遺伝子ファミリーと高い相同性を示すわけであるから、非病原性遺伝子の作用機構として提唱されているエリクター：レセプターモデル (KEEN, 1990) からすると、かいよう形成因子を認識して、結合するレセプターの存在が予想される。植物病原糸状菌では、このレセプターは細胞表層に存在するが、*Xanthomonas* 属細菌では、とんでもないところ (核内) に存在しているらしい。

4 かいよう形成因子のレセプター

エリクター：レセプター説からばかりでなく、かいよう形成因子がロイシンジッパーを持つことから、この因子と結合するレセプター様分子の存在が予測された。そこで、IASys アフィニティーセンサーを用いてカンキツ葉抽出液と純化したかいよう形成因子を反応させると、特異的結合反応を示す信号が検出され、レセプター様分子の存在が確認された。そこで、このレセプター様分子をかいよう形成因子を固定化したアフィニティークロマトグラフィーにより純化して、その N-末端アミノ酸配列を決定した。この部分的配列についてタンパク質アミノ酸配列データバンクで高い相同性を示すタンパク質を調べたところ、その一つはリグニン合成に関与する酵素であった (GLYCIUK and TSUYUMU, 未発表)。このレセプター様タンパク質の直接の機能についてはいまだ確認されていないので、直ちにかいよう形成機構について言及することはできないが、かいよう形成因子との複合体の形成により、リグニン合成が直接活性化されるのか、かいよう形成に関与する植物遺伝子の転写が制御されるのであろう。この点が明らかになれば、カンキツかいよう形成機構の完全解明も近いといえる。

5 かいよう形成因子単独でかいようが形成されるのか？

前にも述べたが、大腸菌に *pthA* 遺伝子と *P. syringae* pv. *syringae* の *hrp* 遺伝子クラスターを持たせると、この大腸菌はカンキツ葉にかいよう症状を呈するようになる。また、*pthA* 遺伝子をパーティクルデリバリー法や、根頭がんしゅ病菌を用いてカンキツ細胞内に導入しても、かいよう形成が見られる (GABRIEL, 私信)。逆に言えば、かいよう形成因子が植物細胞核内に入ることができなければ、かいようは形成されない。したがって、*pthA* 遺伝子の発現、遺伝子産物の分泌、植物への注入、レセプター様分子との結合、かいよう形成経路のスイッチオン等の各反応を抑えれば、かいよう形成を阻止する

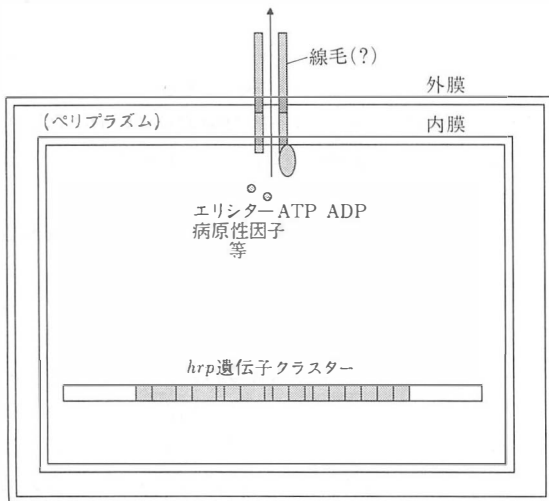


図-2 植物病原細菌の *hrp* 遺伝子クラスターによるタイプ III 分泌機構

ことができるはずである。

もちろん、自然界でかいよう病菌がカンキツに発病させるためには、かいよう形成因子のほかにも、かいよう病菌の傷口や気孔からの侵入、植物細胞間隙内での増殖、植物細胞との相互作用などの際に、病原細菌はそれぞれ巧妙な工夫をしているわけであるから、多数の病原性関連因子を当然備えていることを忘れてはならない。したがって、植物病害防除を考えるとき、当然これらの病原性関連遺伝子及びそれらの翻訳産物も今後かいよう病制圧のための標的となるのであるが、これらについてはまだ実体がつかめていないものが多いので、現状ではこれらを標的にしたかいよう病防除戦略を考えるのは難しい。

II かいよう病制圧のための戦略

これまでに述べた *pthA* によるかいよう形成機構を、筆者の推察も入れて図-3 にまとめた。このかいよう形成までの各段階を阻害して、かいよう病を制圧するための具体的戦略を考えてみよう。

1 かいよう形成因子の生産を阻害する

かいよう形成因子およびその分泌に必要なタイプ III 分泌機構の構成タンパク質の生産をゼロに抑えれば、手取り早くかいよう形成を抑えることができる。レポーター遺伝子融合体を用いた生理学的実験から、かいよう病菌を植物成分を加えた最小培地で生育させると、これらのタンパク質生産遺伝子の発現が誘導されることがわかっている。しかし、どのような遺伝子発現系においても、非誘導時の（この場合は、ペプトン、酵母エキスを含有栄養豊富な条件での培養）遺伝子の発現量はゼロではなく、基底状態のわずかな発現が必ず存在する。したがって、このような戦略は効率的とはいえず、発病を軽減できても、制圧とまではいかないであろう。これらのタンパク質を特異的に不活化する方策があれば、話は別であるが。

2 かいよう形成因子の分泌、植物細胞への注入を阻害する

タイプ III 分泌機構で、線毛が植物側に突出した例を述べたが、細菌の線毛は細胞に吸着する際にレセプターが存在すると考えられている。植物側にレセプターが存在するのであれば、このレセプターを改変すれば、かいよう形成因子の植物への注入を阻害することができるであろう。*hrp* クラスターは同属の細菌間で相同性が高いことが知られており、この戦略は *Xanthomonas* 属細菌によるカンキツ以外の植物病害を抑えるためにも有効であると期待される。

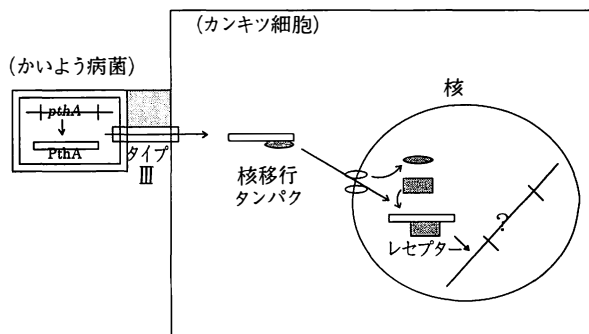


図-3 かいよう形成機構についての仮説

また、最近、我々は病原細菌が宿主細胞に吸着するステップが発病に必要であることを示す結果を得ている。このことから、かいよう形成因子が病原細菌からタイプ III 機構によって植物細胞内へ注入されるためには、病原細菌が植物細胞表面にしっかりと密着して固定され、両細胞の連結を安定化させる必要があるのではないかと考えている。我々は、かいよう病菌をはじめとした *Xanthomonas* 属細菌とナス科植物青枯病菌で発見した新規環状グルカンがこの吸着物質ではないかと考えている (TALAGA et al., 1996)。これを分解する酵素を植物に持たせることによって、病原細菌から植物へのかいよう形成因子の注入は不安定になると考えられる、これを戦略の一つとして加えてもよいかもしれない。

3 かいよう形成因子の核内への移行を阻害する

植物では、核移行性タンパク質の核局在性配列を認識し、結合して、核内へ移行させるタンパク質が同定されている。したがって、この標的タンパク質の核移行をつかさどるタンパク質を改変すれば、かいよう形成を抑えることができる。しかし、このようなタンパク質は他の重要な核局在性タンパク質の移行にも必要であるはずであるから、植物の生理に致命的な障害をもたらす可能性があり、かいよう病制圧の標的としては適当ではないかもしれない。

4 かいよう形成因子と標的タンパク質の結合を阻害する

カンキツ細胞核内にかいよう形成因子のレセプター様タンパク質が存在することについては既に述べたが、このレセプター様タンパク質の改変はかいよう形成を抑える戦略としてよさそうである。この場合も、もちろん標的タンパク質が植物の正常な生理のためになんらかの役割を果たしている可能性はあるが、このタンパク質の活性部位と結合部位が異なることは期待できるので、結合部位のみを遺伝子レベルで改変することは可能ではなく

ある。

5 かいよう形成因子：標的タンパク質複合体の作用点を改変する

これはかいよう形成のための最後のステップとなるものであり、それだけにこの作用点は特異的であることが予測される。したがって、この作用点を阻害しても、植物の正常な生理に及ぼす影響は少ないと考えられ、この方法も有効な戦略と考えられる。現在のところ、この作用点は不明であるが、レセプター様遺伝子のクローニングが可能となっているので、発現ベクターを大量発現することにより、作用点の機能等が明らかになるであろう。

6 かいよう形成過程の複数阻害の利点

今後、かいよう病制圧に上記のような戦略をとる際、これまで述べてきたかいよう形成過程の各段階における戦略を複数組み合わせることが重要である。複数の阻害を組み合わせることにより、かいよう形成をより有効に抑えることができるし、カンキツかいよう病菌の変異により阻害耐性の系統が出現するのを抑えることができるからである。

おわりに

植物の発病は、病原菌と植物との複雑な相互作用の結果として現れるものであるから、病原菌のみを抑えようとする従来の方法には限界がある。特に、植物体内に潜り込んで生息する細菌による病害では防除が難しい。この本稿を通して、病原菌—植物の特異的相互作用に関する知見を基に、各種病害の制圧に向けて分子生物学的手法を駆使した戦略を考えることができるようになっていく時代に入っていることを訴えることができたと願っている。なお、ここで紹介した研究成果の一部は、当研究室の古谷、田中、金森、近藤、GRYCIUK、杉本、永井、石原らによるものであり、記して謝意を表したい。

引用文献

- 1) KANAMORI, H. and S. TSUYUMU (1998): Ann. Phytopath. Soc. Japan 64: 462~470.
- 2) KEEN, N. T. (1990): Ann. Rev. Genet. 24: 447~463.
- 3) SARUP, S. et al. (1991): Phytopathology 81: 802~809.
- 4) TALAGA, P. et al. (1996): J. Bacteriol. 178: 2263~2272.
- 5) TSUYUMU, S. et al. (1996): Molecular aspects of pathogenicity and resistance. APS press St. Paul, p. 105~114.
- 6) YANG, Y. N. and D. W. GABRIEL (1995): Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 627~631.

発行 日本植物防疫協会

土と農薬—環境中における農薬のゆくえ—

鎌塚昭三 山本広基 著

A 5 判, 200 頁 定価 3,675 円 (本体 3,500 円 + 税) 送料 310 円

土は、多くのものに対して分解能力を持ち、環境浄化に大きく寄与している。本書は、この土と農薬との関係について取りまとめた書で、土そのものの、性質・分類・土壌中の生物の解説から、土壌中における農薬の挙動では、散布された農薬の行方、農薬の分解、吸着と移動・土壌生物への影響について解説、また農薬各論では、代表的な 32 種類の農薬について具体例を解説している。付表として、各種農薬の土壌中における半減期、土壌吸着試験用の土壌資料の土性の表を収載する。この分野を理解するための格好の手引書である。

お申し込みは、直接本会出版情報グループに申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

(社)日本植物防疫協会 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11 Tel(03)3944-1561 Fax(03)3944-2103