

糖質結合モジュールを使った 植物土壌病害新規防除法の提案

三重大学大学院地域イノベーション学研究所

かり
蒔
清

た
田
水

しゅう
修
将

いち
一
文

岐阜大学応用生物科学部

はじめに

糖質結合モジュール (Carbohydrate-Binding Module: CBM) とは、糖質に特異的に結合するタンパク質ドメインである (図-1)。当初、これらはセルラーゼにおいて、セルロースに特異的に結合するドメインとして発見された (GILKES et al., 1991)。植物細胞壁に含まれる構造糖質を加水分解するセルラーゼのような酵素は、基質であるセルロースなどの不溶性糖質を分解しなければならない。そこで、進化のうへで基質結合モジュールを獲得する必要があったと考えられる。通常、これらのモジュールは、糖質加水分解酵素の N 末端側、または C 末端側に存在しているが、なかには、複数のモジュールをもつものや、両端にもつものなども存在している。実際、基質結合モジュールをもつことで、酵素は不溶性基質の表面に集められ分解を促進することが可能である (KARITA et al., 1996)。また、原子間力顕微鏡の観察により、セルロース繊維上のセルラーゼの酵素の動きをとらえることができ、基質結合モジュールは、単にセルロース表面に結合するだけではなく、セルロース上を動くことが示されている (IGARASHI et al., 2011)。現在、糖質結合モジュールは、そのアミノ酸配列の相同性から、いくつかのファミリーに分類されており、CAZy データベース (<http://www.cazy.org/>) 上で更新された最新のものにアクセスできる。3月10日現在で、64のファミリーがある。細菌や植物のゲノムの解析が進むにつれて、機能未知の領域が増えており、これらのうちのいくらかは、植物細胞壁の構造多糖に結合するものである可能性が高く、今後もファミリーは増加すると考えられる。

糖質結合モジュールは、その結合様式によりいくつかのタイプに分類されている。セルロースの表面に結合するフラットな平面をもつタイプ A、オリゴ糖のような基質に結合するクレフトと呼ばれる溝をもつタイプ B、糖鎖の末端を認識して結合するポケットと呼ばれる穴状の

構造をもつタイプ C である。これまでに、構造が解かれた糖質結合モジュールの基本ホールドは β バレル構造が多く、糖質との結合にはトリプトファン、チロシンといった芳香族アミノ酸が関与している。これらのアミノ酸の芳香環は、ブドウ糖環と重なりにより相互作用する。また、多くのアミノ酸側鎖が糖の水酸基と相互作用し、これらにより糖質結合モジュールは糖質を認識し、特異的に結合する (BORASTON et al., 2004; HASHIMOTO, 2008)。

I 植物における糖質結合モジュール

植物で見つかった糖質結合モジュールとしては、ファミリー 43 に分類されたオリーブの Ole e 10 と呼ばれる花粉管タンパク質が知られている (BARREL et al., 2005)。ファミリー 43 の糖質結合モジュールは、 β -1, 3-グルカン (カロース) に結合する性質があり、広く植物に保存され分布している。また、植物細胞壁にはエクспанシンというタンパク質の存在が知られており、細胞壁中の多糖類と結合することにより細胞壁の伸長に重要な働きをしている (COSGROVE, 2000)。これらの糖質結合モジュールやタンパク質が、植物細胞壁中で、どのように機能しているかは不明な点もある。しかし少なくとも植物の細胞壁が機能するうへで重要な働きをもっていると考

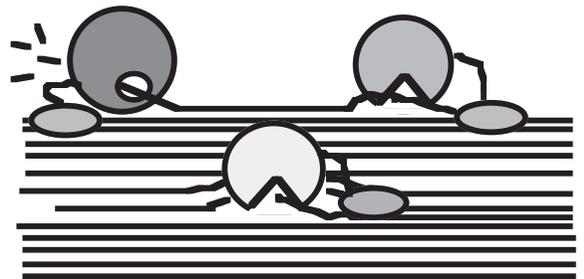


図-1 セルラーゼの概念的な構造

触媒モジュールと糖質結合モジュールから構成され、二つのモジュールをリンカー領域がつないでいる。糖質結合モジュールは、セルロース表面に結合することにより、酵素の触媒モジュールを適した基質へと集める。

Suppression of Plant Diseases Caused by Soil-Born Plant Pathogens with Carbohydrate-Binding Modules. By Shuichi KARITA and Masafumi SHIMIZU

(キーワード: 糖質結合モジュール, エリシター, 青枯病)

えることができる。

II 植物病原菌の糖質結合モジュール

植物病原菌 *Phytophthora parasitica* には、セルロースに結合するエリシター活性をもつタンパク質がある。このタンパク質はファミリー 1 に属する糖質結合モジュールをタンデムに二つもっており、部位特異変異導入により、このエリシター活性は、この糖質結合性により誘導されることが報告されている (GAULIN et al., 2006)。このタンパク質は加水分解活性を示さず、植物細胞壁にタンパク質が結合することで植物側に様々な防御反応が起きている。詳細な機構は不明であるが、これらのタンパク質が細胞壁に結合するとき、植物細胞内の Ca^{2+} の濃度が上昇し、様々な防御応答が誘導されると考えられている (DUMAS et al., 2008)。*Phytophthora* 属には、ほかにもいくつかのファミリー 1 糖質結合モジュールをもつタンパク質が見つかっているが、エリシター活性は確認されていない (JONES et al., 2011)。

III スオレニン (swollenin)

スオレニンは、セルラーゼ生産性糸状菌 *Trichoderma reesei* で見つかったタンパク質で、ファミリー 1 の糖質結合モジュールとエクспанシン様のドメインで構成されている。このタンパク質は、植物のエクспанシンとの相同性検索で発見され、還元糖を生成することなく(糖鎖を切断することなく)綿繊維の構造を崩壊することから、名付けられた (SALOHEIMO et al., 2002)。生物防除剤として知られている *Trichoderma asperellum* * のスオレニンタンパク質をアミノ酸配列に基づき合成し、その水溶液を浸透したところ、キュウリの根や葉に対して、*Botrytis cinerea* や *Pseudomonas syringae* の感染を制御することが示された。この防御応答には、糖質結合モジュールが関与していることが示された (BROTMAN et al., 2008)。

IV 我々の取り組み

このような先行研究により、植物細胞壁に結合するタンパク質は植物防御応答を起こす可能性があることがわかった。微生物酵素による植物細胞壁の分解機構を解明し、それを応用することでバイオマスを有効利用できるのではないかと考え、我々はこれまで数多くの糖質結合モジュールの研究を行ってきた。上記に述べたように、植物に効果があると報告されている糖質結合モジュール

は、ファミリー 1 に属するものである。しかし、すべてのファミリー 1 のモジュールにそのような効果があるわけではない。ファミリー 1 のモジュールは、タイプ A のモジュールで、セルロース平面と相互作用する。そこで、糸状菌のセルラーゼのファミリー 1 に属するモジュールと、細菌に由来するタイプ A のファミリー 3 に属するモジュールについて、植物に対して防御応答を与えるかを検討した。ファミリー 1 として *Trichoderma reesei* のセロビオヒドロラーゼ I のもつ糖質結合モジュールを、シアン蛍光タンパク質 (CFP) と融合し、大腸菌で発現した。これを精製した後使用した (*TrCBM1-CFP*)。ファミリー 3 として、嫌気性セルロース分解細菌 *Clostridium josui* のセルラーゼ複合体セルロソームの骨格タンパク質がもつ糖質結合モジュール (KAKIUCHI et al., 1999) を大腸菌で発現し、精製した (*CjCBM3*)。これらの精製タンパク質を 20 mM リン酸カリウム緩衝液で透析し、25 μM の濃度に設定して試験に使用した。

1 トマト '桃太郎' における青枯病抑制効果

培土を詰めたセルトレイにトマト種子 '桃太郎' を播種し、ガラス温室内で育苗した。なお、1 区 7 株とした。草丈が約 10 cm に成長した苗に、糖質結合モジュールを含む溶液 (*TrCBM1-CFP* 溶液) 3 ml を噴霧した。噴霧処理から 7 日後、苗を青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 汚染土 (10⁶ cfu/g) を詰めたポットへ移植し、同温室内で栽培を続けた。移植後 3 日後に 3 ml の CBM 溶液を再度噴霧した。2 回目の噴霧後、4 日目に発病を調査した。さらに茎内で増殖した病原菌の密度 (cfu/g) を測定した。

結果として、対照区では 86% のトマト株が青枯病を発病し枯死した。一方、*TrCBM1-CFP* を噴霧したトマト株では枯死率は 29% にとどまり、発病抑制効果が認められた (図-2)。また、茎内の病原菌を比較したところ、*TrCBM1-CFP* 処理区では、対照区の菌数が三分の一に減少していた (図-3)。この結果から、*TrCBM1-CFP* の噴霧処理によりトマト株が青枯病に耐病化し、トマト体内への病原菌の感染および増殖が抑制されることが明らかとなった。

2 トマト 'マイクロトム' における青枯病抑制効果

バーミキュライトを詰めたセルトレイにトマト種子 'マイクロトム' を播種し、液体肥料を与えながら人工気象器内で 30℃ に管理し育苗した。なお 1 区 6 株とした。草丈が約 2 cm に生長した苗に 3 ml の CBM 溶液を噴霧した。噴霧処理から 3 日後、青枯病菌汚染土 (10⁶ cfu/g) を詰めたポットに苗を移植し、同気象器内で培養を続けた。移植から 3 日後に 3 ml の CBM 溶液を再度噴霧した。

* 国内では未登録。

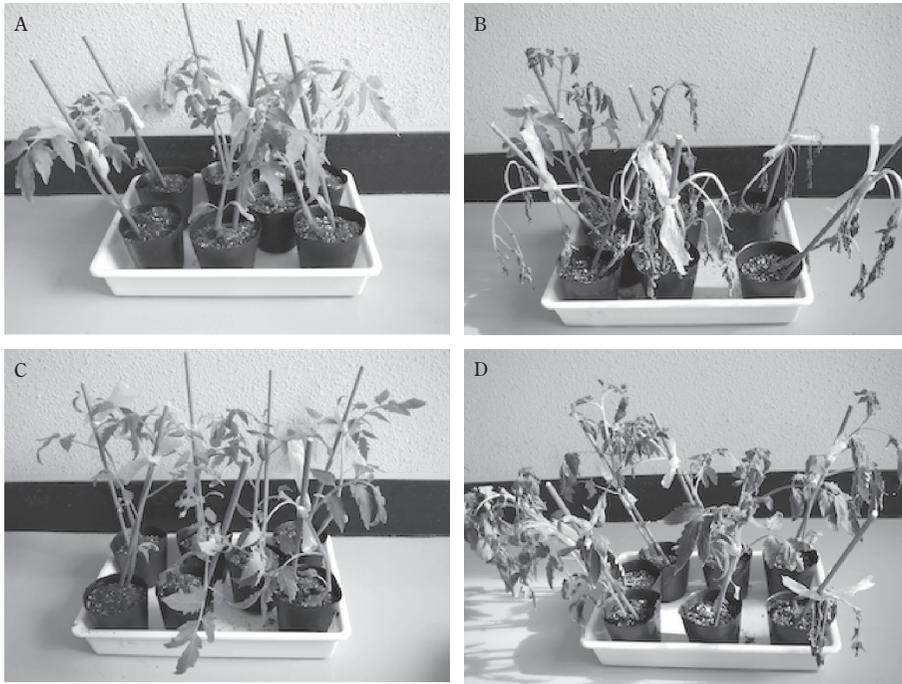


図-2 CBM 溶液噴霧によるトマト‘桃太郎’青枯病害抑制の様子
BSA (A, B), *TrCBM1*-CFP (C, D) の噴霧効果を示した。移植時 (A, C) と2回目噴霧4
日後 (B, D) のトマト外観を示した。

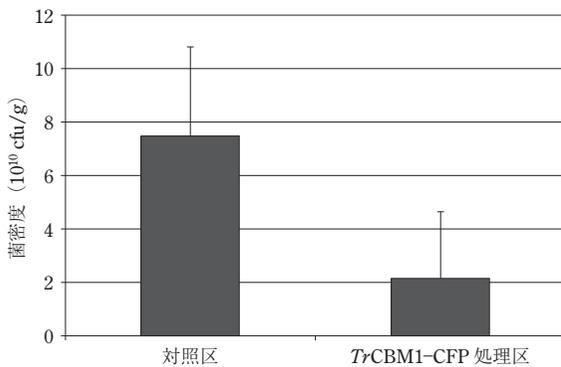


図-3 トマト‘桃太郎’茎内で増殖した病原菌の密度

2回目の噴霧から4日から11日までの間、病徴の進行を調査し、以下の6段階の発病指数に分類した。発病指数 (0: 萎れた葉の割合が0%, 1: 1~25%, 2: 26~50%, 3: 51~75%, 4: 76~99%, 5: 100%)。また発病指数を用いて防除価を以下の式にて算出した。

$$\text{防除価} = \{1 - (\text{処理区の平均発病指数}) / (\text{対照区の平均発病指数})\} \times 100$$

対照区では、2回目のCBM溶液噴霧から4日後には100%のトマト株が枯死した (図-4)。一方、*TrCBM1*-CFP 処理区で発病が抑制され、2回目噴霧後4日後の発病指数は1.3 (防除価74)、11日後の発病指数は3.3 (防除価34) であった。さらに *CjCBM3* 処理区では、2回目噴霧4日後では、発病株は全く現れず (防除価100)、2回目噴霧11日後でも発病指数が0.8 (防除価84) にとどまった (表-1)。また、対照区と比較してCBM処理区では、11日後の乾燥重量が有意に多かった (図-5)。このように、CBMタンパク質の処理は、土壌伝染性の細菌病害である青枯病に高い防除効果を示すことがわかった。

3 ホウレンソウ‘おかめ’に対する効果

培土を詰めたセルトレイにホウレンソウ種子‘おかめ’を播種し、人工気象器内で26℃に管理し、育苗した。なお1区13株とした。播種から4日後に苗に3mlのCBM溶液を噴霧した。播種処理から3日後、萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* GF960) (10^4 cfu/g) を接種した。接種から3日後に3mlのCBM溶液を再度噴霧した。2回目噴霧から5日後、病徴の進行を調査し、以下の6段階の発病指数に分類した。発病指数 (0:

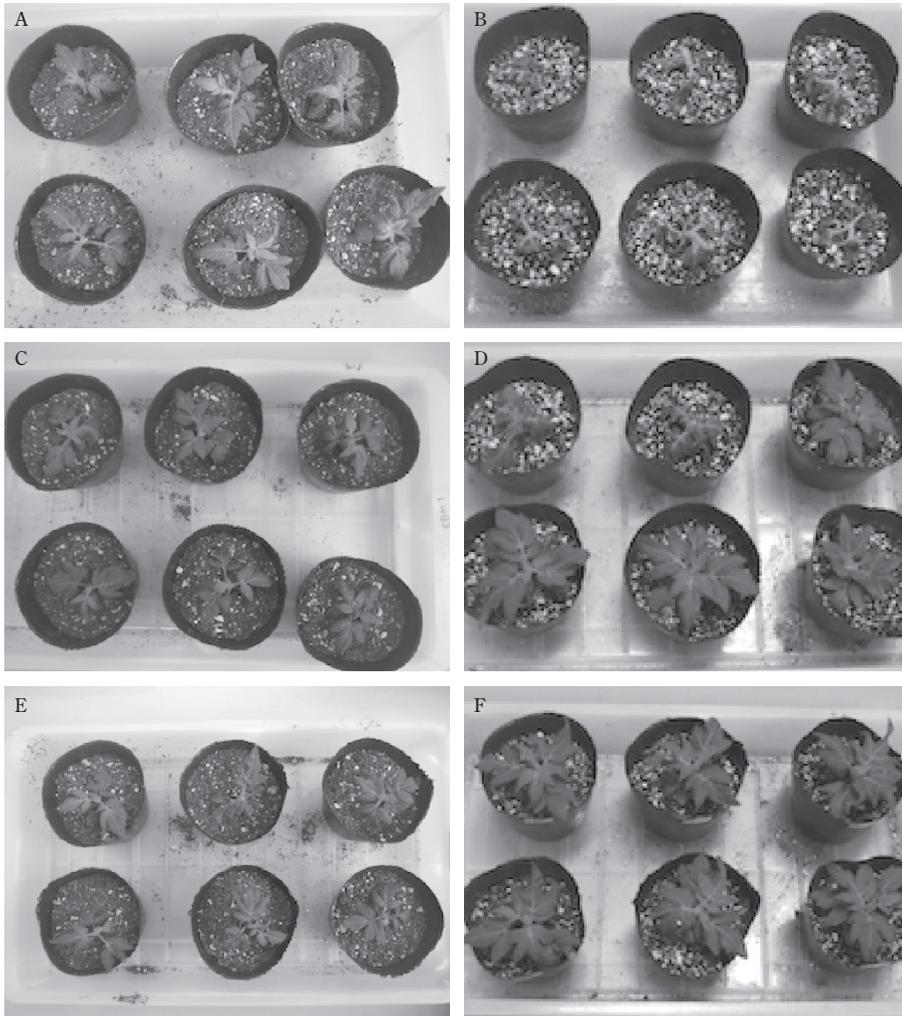


図-4 CBM 噴霧によるトマト‘マイクロトム’青枯病抑制の様子
CFP (A, B), *TrCBM1*-CFP (C, D), *CjCBM3* (E, F) の噴霧効果を示した。移植時 (A, C, E) と CBM2 回目噴霧 4 日後 (B, D, F) のトマト外観を示した。

表-1 CBM 噴霧によるトマト‘マイクロトム’青枯病抑制効果

	2 回目噴霧後 4 日目		2 回目噴霧後 11 日目	
	発病指数	防除価	発病指数	防除価
対照区	5	—	5	—
<i>TrCBM1</i> -CFP 処理区	1.3	74	3.3	34
<i>CjCBM3</i> 処理区	0	100	0.8	84

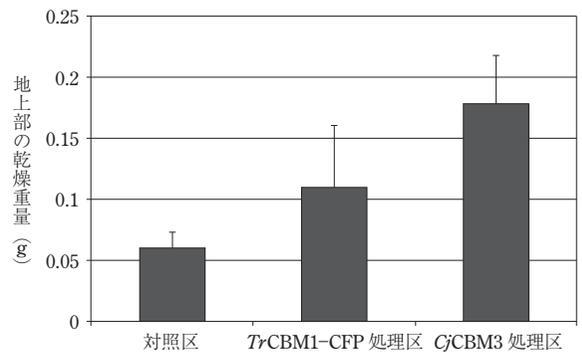


図-5 青枯病発病後のトマト‘マイクロトム’地上部の乾燥重量
CBM 溶液 2 回目噴霧後 11 日目の地上部乾燥重量を示した。

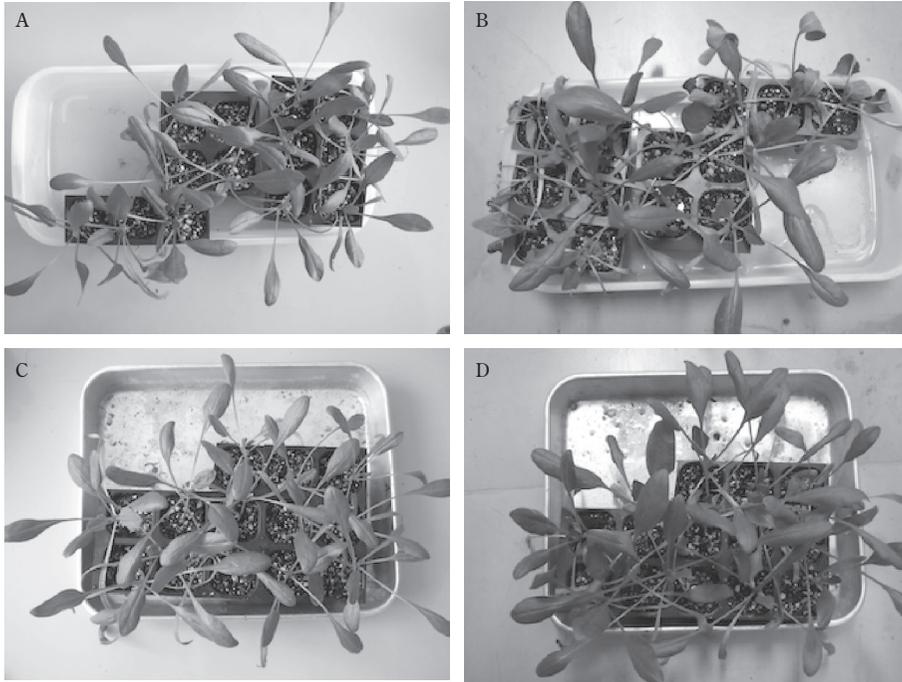


図-6 CBM 噴霧によるハウレンソウ萎凋病抑制の様子
緩衝液のみ (A, B), *CjCBM3* (C, D) の噴霧効果を示した。2 回目 CBM 噴霧時 (A, C)
と 2 回目 CBM 噴霧から 5 日後 (B, D) のハウレンソウ外観を示した。

健全, 1: 地上部は健全だが根部表面が褐変, 2: 地上部は健全だが根部導管が褐変, 3: 地上部が萎縮, 4: 枯死)。さらに発病指数を用いて防除価を算出した。

CjCBM3 の噴霧は, ハウレンソウ萎凋病の発病を顕著に抑制した (図-6)。表-2 に示すように, 無処理区の発病指数は 2.2 であったが, *CjCBM3* 処理区では, 1.0 (防除価 55) であった。この結果から, *CjCBM3* の葉面散布は, 土壌伝染性の糸状菌病害にも有効であることがわかった (表-2)。

以上のように, 糖質結合モジュールの水溶液を噴霧することにより, 植物に病原抵抗性を誘導できることがわかった。

おわりに

実験室レベルでは, 上に述べたように植物に抵抗性を誘導することができるが, 実際の圃場レベルで同様な効果が得られるかどうかはわからない。また, もし市販するとすれば, タンパク質溶液という製品のために, 開封後, 腐敗する可能性もある。また購入後の安定性にも課題があるであろう。少なくとも 1 年の効果を保証する必要がある。さらに, 糖質結合モジュールの中には, 花粉

表-2 CBM 噴霧によるハウレンソウ萎凋病抑制効果

	発病指数	防除価
対照区	2.2	—
<i>CjCBM3</i> 処理区	1	55

アレルギーのアレルギー源として同定されたもの (ファミリー 43) もあるので, 噴霧することで作業者に新たなアレルギー作用を起こす可能性も考える必要がある。このように, 糖質結合モジュールを今すぐ市販できるような状況ではない。

ただ, このような細胞壁に結合するという物理現象で, 植物の抵抗性誘導ができるのであれば, 同様な効果を示す薬剤の開発も可能であるかもしれない。多くの糖質結合モジュールの立体構造が解かれており, その構造的な特徴はわかっている。多くの糖質結合モジュールの糖質への結合は, 芳香族アミノ酸 (特に, トリプトファンとチロシン) の芳香環が関与しており, 糖環との疎水的な重なりが重要である。これらの情報から細胞壁に結合する薬剤のデザインが可能ではないだろうか。

糖質結合モジュールのうち, 目下のところ, 少なくとも

も20以上のファミリーが、植物細胞壁に結合することがわかっている。これらの糖質結合モジュールは、細胞の種類を認識したり、植物細胞壁の異なる部分を認識したりしている (ARAKI et al., 2010)。今回の実験では、フラットな結合面をもつタイプAに属するファミリー1と3の糖質結合モジュールを使用したが、他のファミリーのもの(タイプBに属するもの)では、異なる結果になるのかもしれない。また、植物種や病原菌の種類にも、特異性があるかもしれない。

いずれにしても、研究課題はたくさん存在している。

引用文献

1) ARAKI, Y. et al. (2010): Biosci. Biotechnol. Biochem. 74: 802 ~

805.
 2) BARREL, P. et al. (2005): Biochem. J. 390: 77 ~ 84.
 3) BORASTON, A. et al. (2004): ibid 382: 769 ~ 781
 4) BROTMAN, Y. et al. (2008): Plant Physiol. 147: 779 ~ 789.
 5) COSGROVE, D. J. (2000): Nature 407: 321 ~ 326.
 6) DUMAS, B. et al. (2008): Trends Plant Sci. 13: 160 ~ 164.
 7) GAULIN, E. et al. (2006): Plant Cell 18: 1766 ~ 1777.
 8) GILKES, N. R. et al. (1991): Microbiol. Rev. 55: 303 ~ 315.
 9) HASHIMOTO, H. (2008): Cell. Mol. Life Sci. 63: 2954 ~ 2967.
 10) IGARASHI, K. et al. (2011): Science 333: 1279 ~ 1282.
 11) JONES, R. W. et al. (2011): PLoSOne 6: e23555.
 12) KAKIUCHI, M. et al. (1998): J. Bacteriol. 180: 4303 ~ 4306.
 13) KARTTA, S. et al. (1996): J. Ferment. Bioeng. 81: 555 ~ 558.
 14) SALOHEIMO, M. et al. (2002): Eur. J. Biochem. 269: 4202 ~ 4211.

新しく登録された農薬 (24.4.1 ~ 4.30)

掲載は、**種類名**、登録番号：**商品名**(製造者又は輸入者)登録年月日、有効成分：含有量、**対象作物**：対象病害虫：使用時期等。ただし、除草剤・植物成長調整剤については、**適用作物**、**適用雑草**等を記載。(登録番号：23066 ~ 23078)種類名に下線付きは新規成分。※は新規登録の内容。

〔殺虫剤〕

- **ボーベリア バシアーナ水和剤** ※新剤型
 23069: ボタニガード水和剤 (アリストライフサイエンス) 12/04/11
 ボーベリア バシアーナ GHA 株 分生子: 4.4×10^{10} 個/g
野菜類 (施設栽培): コナジラミ類: 発生初期
 ● **ジノテフラン粒剤** ※新製剤
 23074: アトラクトン箱粒剤 (三井化学アグロ) 12/04/25
 23075: スターダム箱粒剤 (北興化学工業) 12/04/25
 ジノテフラン: 12.0%
稲 (箱育苗): カメムシ類: 移植当日
稲 (箱育苗): イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ: 移植3日前~移植当日

〔殺虫殺菌剤〕

- **ジノテフラン・プロベナゾール剤** ※新製剤
 23076: Dr. オリゼスタークル箱粒剤 OS (三井化学アグロ) 12/04/25
 23077: 明治 Dr. オリゼスタークル箱粒剤 OS (Meiji Seika ファルマ) 12/04/25
 23078: ロングリーチ箱粒剤 (北興化学工業) 12/04/25
 ジノテフラン: 12.0%, プロベナゾール: 24.0%
稲 (箱育苗): カメムシ類: 移植当日
稲 (箱育苗): ウンカ類, イネミズゾウムシ, イネドロオイムシ, いもち病: 移植3日前~移植当日

〔殺菌剤〕

- **トルクロホスメチル・フラマトピル水和剤** ※新混合剤
 23071: ダブルイーグル (住化グリーン) 12/04/11
 トルクロホスメチル: 40.0%, フラマトピル: 2.5%
西洋芝 (ベントグラス): 雪腐小粒菌核病: 根雪前

〔除草剤〕

- **インダジフラム水和剤** ※新規化合物
 23066: スペクタクルフロアブル (バイエルクロップサイエ

- ンス) 12/04/06
 インダジフラム: 19.1%
日本芝: 一年生雑草
 ● **ペンディメタリンマイクロカプセル剤** ※新剤型
 23070: ウェイアップアクアキャップ (BASF ジャパン) 12/04/11
 ペンディメタリン: 38.7%
日本芝: 一年生雑草 (キク科を除く)
西洋芝 (パーミュダグラス): 一年生雑草 (キク科を除く)
 ● **d-リモネン乳剤** ※新規化合物
 23073: オレンジパワー (エス・ディー・エス バイオテック) 12/04/25
 d-リモネン: 10.0%
樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面, 鉄道等): 一年生雑草, 多年生雑草, コケ類

〔農薬肥料〕

- **ウニコナゾール P 複合肥料** ※新規参入
 23067: スマッシュ A14 (日本エコアグロ) 12/04/10
 ウニコナゾール P: 0.012%
 23068: スマッシュ A21 (日本エコアグロ) 12/04/10
 ウニコナゾール P: 0.0080%
水稻: 節間短縮による倒伏軽減: 出穂 25 ~ 20 日前

〔展着剤〕

- **展着剤** ※新製剤
 23072: アイヤーエース (アグロカネショウ) 12/04/11
 ポリオキシエチレンアルキルエーテル: 10.0%
殺菌剤 (果樹類, 野菜類, 豆類 (種実), いも類, てんさい, 茶, 花き類・観葉植物, 芝): 添加
殺虫剤 (稲, 果樹類, 野菜類, 豆類 (種実), いも類, てんさい, 茶, 花き類・観葉植物, 芝): 添加