学会賞受賞者講演

Pseudomonas syringae の鞭毛を介した植物相互作用の研究[†]

一 瀬 勇 規 *

ICHINOSE, Y.: Study of flagella-mediated interactions between plants and *Pseudomonas syringae*

植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* には宿主や病徴を異にする多くの病原型 (pathovar) が存在し、宿主植物の葉や茎、果実の傷口、気孔などから侵入後、細胞間隙で増殖・移動し、主に斑点・褐変・枯死を引き起こす。これまでに 50 以上の病原型が報告され、それら病原型はそれぞれ固有の宿主植物に感染が可能である。例えば、タバコ野火病菌 (*P. syringae* pv. *tabaci*

6605, 以下 Pta6605 と略す) はタバコ葉に淡黄色水浸状小斑点を生じ、その周辺に黄化を引き起こすものの、ダイズやトマト、シロイヌナズナには非病原性である。植物病原細菌の非宿主植物に対する過敏反応 (HR) 誘導能と宿主植物に対する病原性に必要な領域として、*hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity) 遺伝子クラスターが知られている。*hrp* 遺伝子クラスターには、Type III 分泌経路を構成するタンパク質遺伝子、*hrp* 遺伝子の制御因子遺伝子の他、非宿主植物に過敏反応を誘導するタンパク質エリシター harpin をコードする *hrpZ* などが存在する。私たちは *P. syringae* のいくつかの病原型細菌において *hrpZ* 遺伝子を調べたところ、Pta6605 の *hrpZ* は中央部に 326 塩基の内部欠損とそれに伴うフレームシフトを起こしており、HR 誘導能を欠失していることを見出した。Harpin は *P. syringae* の非宿主植物に対する主要な HR 誘導因子であると考えられていたが、Pta6605 を非宿主植物に高濃度で接種すると HR が誘導されることより、Pta6605 には harpin 以外のエリシターが存在すると推察された。そこで、Pta6605 の培養上清からトマトに対し、HR を誘導する分子の検索を行い、鞭毛構成タンパク質フラジェリンを同定した。

1. フラジェリンの防御応答誘導能と糖鎖修飾

Pta6605 フラジェリンの植物相互作用における機能を解析するために、フラジェリン遺伝子 *fliC* を特異的に欠損させた $\Delta fliC$ 変異株と鞭毛の先端でフラジェリンを多量体化する HAP2 タンパク質の遺伝子 *fliD* を欠損させた $\Delta fliD$ 変異株を作出した。両変異株は鞭毛を失うため運動能を有せず、宿主タバコに対する病原性は共に低下した。一方、 $\Delta fliC$ 変異株の非宿主トマトに対する HR 誘導能は低下したものの、単量体フラジェリンを細胞外に分泌する $\Delta fliD$ 変異株では Pta6605 の野生株接種の場合より激しい HR 細胞死を誘導した。これらの変異株の解析により、鞭毛フラジェリンは本菌の宿主に対する病原性と非宿主に対する HR 誘導能に必要であることが判明した。

Pta6605 のフラジェリンはシロイヌナズナに対しても細胞死を誘導し、多くの防御関連遺伝子の発現を誘導した。そのうちの一つである *WRKY41* を高発現するシロイヌナズナを作出したところ、トマト斑葉細菌病菌 (*P. syringae* pv. *tomato* DC3000, 以下 Pto DC3000 と略す) に対する抵抗性を高めたものの、そ菜類軟腐病菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* EC1) に対しては罹病性が高まった。また、*WRKY41* 高発現シロイヌナズナは、構成的に *PR5* 遺伝子を発現し、ジャスモン酸による *PDF1.2* 遺伝子の誘導発現を抑制した。これは *WRKY41* によりサリチル酸経路が活性化され、ジャスモン酸経路が抑制されたことを示唆している。以上の結果は、*WRKY41* が異なる感染戦略を有する様々な病原体に対し、適切な防御応答を発現するための鍵因子として機能していることを示している。

Pta6605 のフラジェリンはタバコに対して顕著な細胞死を誘導しないが、Pto DC3000 やダイズ斑点細菌病菌 (*P. syringae* pv. *glycinea* race 4, 以下 Pgl4 と略す) のフラジェリンをタバコに処理すると活性酸素の急激な生産を伴う細胞死が観察

[†]平成 21 年 3 月 26 日 平成 21 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

* 岡山大学大学院自然科学研究科 Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

された。また、これらのフラジェリンのアミノ酸配列は互いに高い相同性を有しており、特に Pta6605 と Pgl4 のフラジェリンアミノ酸配列は同一であった。これらの *fliC* を大腸菌の発現ベクターに導入し、生産させた組換えフラジェリンはいずれもタバコに対して同様な強い細胞死誘導能を有していた。これらの結果は、フラジェリンの HR 誘導特異性に翻訳後の修飾が関わっていることを示唆している。実際に、これらのフラジェリンは約 3.2 kDa の糖鎖が結合する糖タンパク質であることを見出した。また、それぞれの *fliC* 遺伝子の上流に推定の糖転移酵素遺伝子 (*orf1*, *orf2*) を見出した。そこで、Pta6605 と Pgl4 の各遺伝子欠損変異株を作出すると、 $\Delta orf1$ のフラジェリンは全く糖鎖修飾されず、 $\Delta orf2$ では部分的な糖鎖修飾が観察され、両遺伝子ともフラジェリンの糖鎖修飾に必要な糖転移酵素遺伝子であると考えられた。そこで *orf1*, *orf2* を *flagellar glycosyltransferase 1, 2* (*fgt1*, *fgt2*) と命名し直した。また、両変異株のそれぞれの宿主植物に対する病原性は顕著に低下した。

一方、*fliC* と *fgt2* の間に位置する遺伝子 *orf3* は、アシル基の伸長酵素 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III の遺伝子と相同性を示した。そこで $\Delta orf3$ 変異株を作出したところ、フラジェリン分子量は低下しなかったが、Pta6605 の菌体密度感知分子であるアシルホモセリンラクトンの合成能を殆ど失い、病原性も著しく低下した。また、 $\Delta orf3$ 変異株ではバイオサーファクトンと細胞外多糖の合成が亢進し、シデロフォアの生産が低下した。これらの表現型はアシルホモセリンラクトン合成酵素遺伝子である *psylI* を欠損した変異株と極めて類似しており、本菌はアシルホモセリンラクトンを介して細胞外多糖生産を負に、シデロフォア生産を正に制御していることが示唆された。また、興味深いことに、鞭毛運動能を欠損した $\Delta fliC$ や $\Delta fliD$ 変異株はアシルホモセリンラクトンの合成能が著しく低下することを見出した。この事実と、鞭毛遺伝子クラスターにおけるアシルホモセリンラクトン合成酵素遺伝子の存在は、本菌の運動能と菌体密度感知機構を橋渡しする未知の制御機構が存在することを示唆している。

フラジェリンにおける糖鎖修飾アミノ酸を同定することを目的として、Pta6605 の野生株と $\Delta fgt1$ 変異株から精製したフラジェリンをそれぞれペプチダーゼ消化し、液体クロマトグラフィーで分画後、野生株特有の保持時間で溶出されるペプチドを修飾アミノ酸含有ペプチドとして分取した。それらのアミノ酸配列を解読することによって、糖鎖修飾アミノ酸の候補を特定した。特定したアミノ酸は全てセリンであり、セリンをアラニンに置換させた変異株のフラジェリンと野生株のフラジェリンの分子量を MALDI-TOF MS 解析で測定、比較することにより、6 カ所のセリン (143, 164, 176, 183,

193, 201) を糖鎖修飾アミノ酸と同定した。6 カ所のセリンにはいずれもおおよそ 540 Da からなる糖鎖が結合していると推測された。また、6 箇所の糖鎖修飾セリンを全てアラニンに置換した変異株 (6S/A) を作出し、フラジェリン分子量を計測したところ、アミノ酸配列から計算される分子量にほぼ一致し、Pta6605 のフラジェリンは全部で 6 カ所の糖鎖修飾セリンをもつことが判明した。さらに、Pgl4 フラジェリンについても同様な解析を実施し、Pta6605 と同じ 6 カ所のセリンが糖鎖修飾されていることを明らかにした。

Pta6605 の $\Delta fgt1$, $\Delta fgt2$ 変異株や全ての 6S/A 変異株は、野生株に比べ液体中における swimming 運動能、半固形培地上における swarming 運動能、ポリスチレンに対する付着能、タバコに対する病原性がいずれも低下した。また、Pta6605 フラジェリンの 1 残基の糖鎖修飾セリンをアラニンに置換した 6 つの変異株 (S143A, S164A, S176A, S183A, S193A, S201A) の中では、フラジェリンの分子モデルにおいて鞭毛最外層に露出すると予想された 176 番目及び 183 番目のセリンをアラニンに置換した株 (S176A, S183A) において、上述の運動能や病原性などの低下が特に著しかった。

また、NaCl 濃度や pH の異なる液体中における鞭毛の多型変換と安定性を調べたところ、糖鎖欠損変異株由来の鞭毛は、環境条件の変化に対応した特定の構造を示さず、安定性の低下が運動能の低下をもたらしたと考えられた。従って、フラジェリンの糖鎖修飾は、病原性に必要な運動能を保持する上で重要であると思われる。

Pta6605 並びに Pgl4 のフラジェリンの糖鎖構造を詳細に調べると、いずれの病原細菌においても S201 には、2 個の L-ラムノースと通称ビオサミンとよばれる 4-アミノ-4,6-ジデオキシグルコースの誘導体 (β -D-Quip4N (3-hydroxy-1-oxobutyl) 2Me-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap) が結合していることを明らかにした。これは植物病原細菌で初めて明らかにされた糖タンパク質糖鎖の構造である。また、フラジェリン糖鎖の主要構成糖はラムノースであり、Pta6605 では全てのラムノースが L 体であるのに対し、Pgl4 では L 体に加え、D 体も共存していることが判明した。この糖鎖構造の違いがフラジェリンの植物種特異的 HR 誘導能、さらには宿主特異性の決定に関与している可能性が推察される。

2. フラジェリンに保存される分子パターンの病原性における重要性

植物は微生物あるいは病原体に特徴的な分子パターン (microbe/pathogen-associated molecular pattern, MAMP/PAMP) を認識し、防御応答を始動することが知られている。フラジェリンでは、アミノ末端側に保存されるペプチド配列 flg22

が典型的な MAMP の一つとして、植物に防御応答を誘導する。 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) においてもフラジェリンの flg22 相当配列がシロイヌナズナの防御応答誘導に重要であると報告された。すなわち、N 末端から 43 番目のアミノ酸がアスパラギン酸 (D) のフラジェリンはシロイヌナズナの防御応答を誘導するが、バリン (V) であるフラジェリンは誘導しなかったことより、D43 は flg22 のエリシター活性に必須のアミノ酸であるとされた。しかしながら、実験に供試された Xcc の運動能は非常に低く、フラジェリンの防御応答誘導能を病原性との関わりの中で議論するには困難と思われた。そこで、病原性において運動能が重要であることが判明している Pta6605 を用いて、43 番目のアミノ酸 D を V, アラニン (A) にそれぞれ置換した変異株 D43V, D43A を作出して防御応答誘導能と病原性を解析した。同時にそれらの変異を導入した flg22 (flg22_{D43V}, flg22_{D43A}) も供試して、防御応答誘導能を解析した。その結果、D43V, D43A の置換変異株ではエリシター活性が低下するとともに、鞭毛運動能、病原性も低下した。しかしながら Pta6605 のロイシン (L) 36 をセリン (S) に、リジン (K) 37 をアルギニン (R) に置換した変異株ではフラジェリンのエリシター活性、運動能、病原性に大きな低下は観察されなかった。また、flg22_{D43V}, flg22_{D43A} は防御応答誘導能を失った。これらの結果は、① flg22, 特に D43 が病原性並びに防御応答誘導能の双方にとって重要な配列であること、②植物は病原菌が病原性維持のた

めに変異を導入できない D43 をパターン認識に利用していることを示している。

D43 を含む flg22 の配列は鞭毛の内部に位置し、安定な鞭毛構造では植物に認識されにくいと考えられる。フラジェリンの糖鎖は鞭毛の安定性を高め、運動能を保持すると共に、flg22 の露出を防ぎ、植物による検出を逃れることに貢献していると考えられる。

謝辞：本研究は岡山大学農学部遺伝子工学研究室に在籍した学生諸氏、田口富美子博士と共に、白石友紀博士、稲垣善茂博士、豊田和弘博士のご協力、ご支援により実施した。ここに記して深謝の意を表したい。また、植物病原細菌研究の魅力をご教示下さいました故山田哲治博士、大学入学以来長きに渡り植物病理学全般をご指導下さいました奥八郎博士、大内成志博士、大阪大学において分子生物学の手解きを下さいました松代愛三博士、森田隆博士、野崎正美博士、宮下知幸博士に感謝申し上げます。細菌の遺伝学的解析には向原隆文博士、鞭毛の構造解析には相沢慎一博士、電子顕微鏡観察には鈴木智子博士、フラジェリン糖鎖の構造解析では吉田充博士、亀山眞由美博士、石井忠博士、小野裕嗣博士、竹内香純博士に多大なるご指導を賜った。深く感謝したい。また、本研究に必要な実験材料を提供して下さいました方々、および様々な実験手法を指導して下さいました国内外の多くの方々に心からお礼申し上げます。