

2008年9月5日

独立行政法人 理化学研究所

病原菌感染に対する植物の防御応答を抑制する遺伝子を発見

- 細菌やカビなどの病原菌に対する植物免疫反応の新たな制御のしくみが明らかに -

人をはじめとする動物では、リンパ球など特別な免疫細胞が、病原菌やウイルスなどの異物を認識し、排除する生体防御システムを持っています。植物は、こうした特別な免疫細胞を持たない代わりに、個々の細胞が病原体を認識し、防御反応を行なう自然免疫を発達させ、感染から身を守っています。自然免疫は、ヒトやショウジョウバエでも存在しますが、植物にとって重要な耐病性戦略の1つです。

植物の自然免疫では、細胞表面のパターン認識受容体が、微生物分子パターン(MAMPs)を検出することで、植物細胞が感染を察知します。細菌のべん毛やカビの細胞壁の主成分であるキチンなどが、植物が認識するMAMPとして知られています。パターン認識受容体からの感染シグナルは、細胞内情報伝達によって核や細胞質に伝わり、微生物の細胞壁を壊す酵素遺伝子の発現や抗菌性化合物の生合成などが起こります。このような防御反応によって、植物は病原体を排除します。

植物科学研究センター植物免疫研究チームは、病原菌に対する防御反応を抑制する3つの遺伝子を見つけ、植物が防御反応を適度に抑えるしくみを保有していることを、世界で初めて明らかにしました。

研究チームは、MAMPsによって発現が上昇する3つの遺伝子「*PUB22*」「*PUB23*」「*PUB24*」に着目し、それらの役割を調べました。この3つの遺伝子がすべて働かないようにしたシロイヌナズナの変異株は、病原体に対する防御反応が強くなる現象を発見しました。実際に野生株と比較して、この変異株は、べと病菌やトマト斑葉細菌病菌に対して抵抗性が上昇し、特に、トマト斑葉細菌病菌に対しては、約32倍も抵抗性が上昇することがわかりました。このような結果から、これら3つの遺伝子は防衛反応を抑制するブレーキ役として働いていることが判明しました。

これらの遺伝子の機能を制御することで、広範囲の病原菌に対して、強い抵抗性を持つ作物の開発が期待できます。

べと病菌に感染した本葉 拡大した感染部

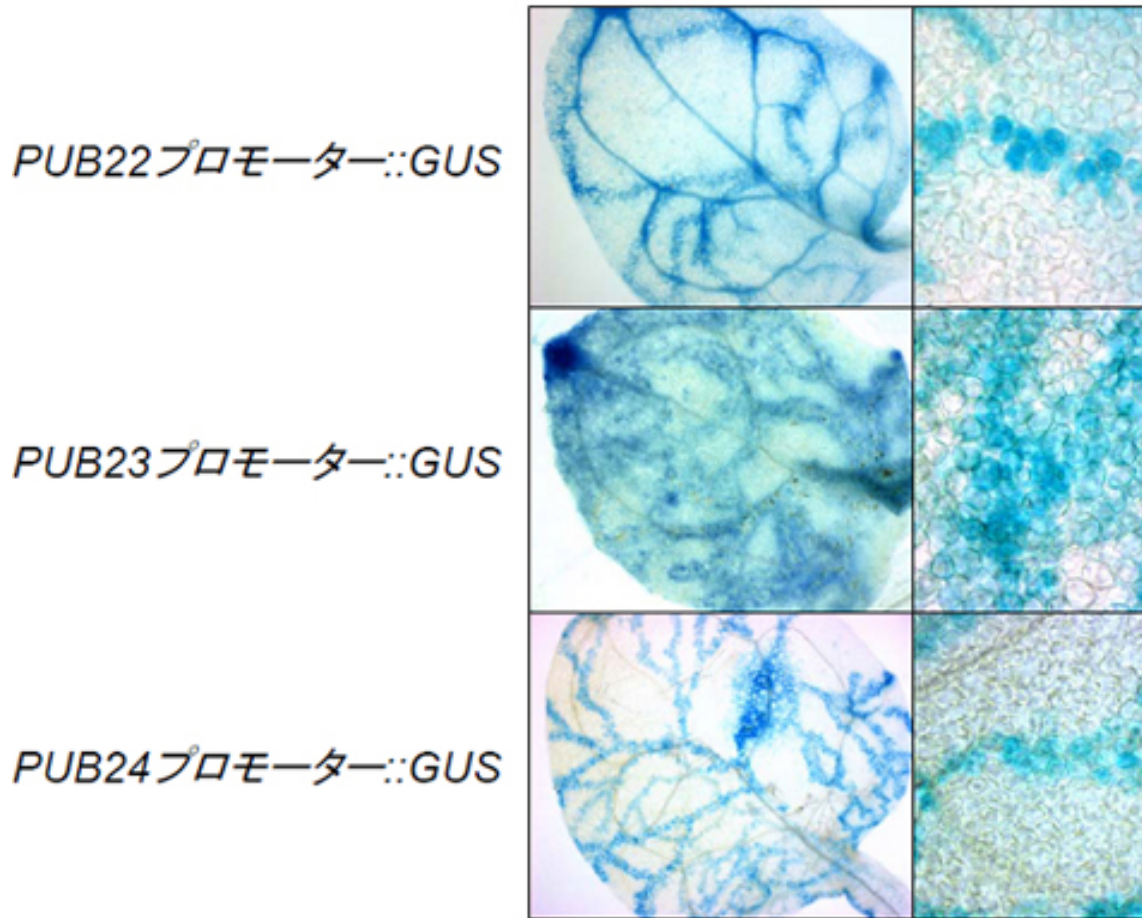


図 *PUB22*、*PUB23*、*PUB24*は、べと病菌糸が接触した細胞で発現

2008年9月5日

独立行政法人 理化学研究所

病原菌感染に対する植物の防御応答を抑制する遺伝子を発見

- 細菌やカビなどの病原菌に対する植物免疫反応の新たな制御のしくみが明らかに -

◇ポイント◇

- ・病原菌感染シグナルで誘導される防御反応のブレーキ役の3つの遺伝子を同定
- ・ユビキチン化によるタンパク質修飾が防御応答抑制に関与
- ・耐病性作物の作出などの応用に新たな知見を提供

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、植物が示す細菌やカビなどの、病原菌に対する防御反応を抑制する3つの遺伝子の同定に成功し、植物が防御反応を適度に抑える制御機構を持っていることを世界で初めて明らかにしました。理研植物科学研究センター（篠崎一雄センター長）植物免疫研究チームの白須賢チームリーダー、Marco Trujillo Linke（マルコ・トゥルヒジョ・リンケ）研究員、市村和也研究員による研究成果です。

植物は、細菌やカビなどの病原菌の感染を察知すると、植物免疫を発動し、外敵から体を守るためにさまざまな防御反応を開始します。例えば、イネいもち病やカンキツかいよう病など、作物の微生物によるほとんどの病気は、病原菌がこの植物免疫を妨害して、うまく機能しないようにすることで感染を成立させる病害です。従って、病気に強く収量の多い作物の開発には、この植物免疫の能力を強化することが大変重要となります。

植物免疫反応では、病原菌の微生物が持つ特徴的な分子群（微生物分子パターン：MAMPs^{*1}）を細胞表面のパターン認識受容体^{*2}（受容体キナーゼ^{*3}）によって検出し、防御反応を開始することが知られています。しかし、これらの分子を認識した受容体以降の情報伝達機構についてはわかっていませんでした。

研究グループは、シロイヌナズナ変異体を用いた解析から、この防御反応誘導のブレーキ役となるタンパク質を作る3つの遺伝子「*PUB22*」、「*PUB23*」、「*PUB24*」を同定しました。これら3つの遺伝子がすべて働かなくなると、病原体に対する防御反応が強くなることを証明しました。植物が、防御反応を適度に抑えるための制御機構を持つことを初めて明らかにしたことになります。

将来、これらの遺伝子の機能を制御することで、さまざまな病害に抵抗性を示す作物の開発が期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*Current Biology*』（9月23日号）に掲載されるに先立ち、オンライン版（9月4日付け：日本時間9月5日）に掲載されます。

1. 背景

動物の獲得免疫系のように、リンパ球などの生体防御に特化した細胞を持たない植物は、個々の細胞が病原体を認識し、防御反応を誘導する自然免疫で感染から体を守っています。植物は、病原体が感染すると、細胞表面のパターン認識受容体（受

容体キナーゼ)が病原体の微生物分子パターン(MAMPs)を検出し、細胞壁を分解する酵素や抗菌性化合物を作ること、病原体を排除しようとします。ヒトやショウジョウバエの自然免疫でも同様に、パターン認識受容体がMAMPsを認識し、防御応答が誘導されます。自然免疫機構に関係するタンパク質群には、動植物間である程度の類似性が見られ、高等動植物に共通した基礎的な生体防御機構として働いていると考えられています。

この自然免疫能は、植物の耐病性戦略の1つとして有効に機能しています。そのため、植物は、自然界の大多数の微生物に対する耐性を獲得するようになっていきます。このような植物免疫を構成する遺伝子の同定や調節機構の解明は、病気に強い有用植物の作出や、植物の自然免疫能を強化する薬剤の開発など、将来の応用へ向けて重要な知見をもたらすことが期待されています。

ユビキチン化反応^{*4}は、真核生物におけるタンパク質の主要な修飾反応の1つです。76個のアミノ酸が構成しているユビキチンは、活性化酵素(E1)、転移酵素(E2)、連結酵素(E3)の複合酵素系で、標的タンパク質に結合することで、タンパク質を修飾し、その機能を制御します。なかでもE3酵素は、ユビキチン化反応の中で基質特異性を決定している重要なタンパク質で、標的タンパク質を選別して結合し、それにユビキチンを連結する役割を持ちます。アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナでは、E3酵素をコードする1,300以上の遺伝子がゲノム上に存在します。この数は、遺伝子全体の約5%も占めることから、ユビキチン化によるタンパク質修飾が、細胞内の多くのプロセスで重要な役割を果たしていることが予想されていました。

ユビキチン化による標的タンパク質の制御は、ユビキチンの結合の様式によって異なります。たとえば、ユビキチン化されたタンパク質は、26Sプロテアソーム^{*5}によって選択的に分解することがよく知られています。そのほかに、細胞外または細胞表面の物質を取り込む作用を持つエンドサイトーシス^{*6}によってほかの細胞内小器官へ輸送されたり、活性化されたりする場合があります。興味深いことに、動物や植物の病原菌には、E3酵素に似たタンパク質を宿主の細胞に注入して、宿主の防御反応を抑制するものも報告されており、ユビキチン化は、植物の自然免疫反応においても何らかの役割を果たしていることが示唆されていました。しかし、これまで、MAMPsにより誘導される自然免疫反応にユビキチン化がどのような役割を果たしているのか明らかにされていませんでした。

2. 研究手法と成果

研究チームは、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、MAMPsにより遺伝子発現が上昇する、3つの類似したユビキチンE3酵素遺伝子「*PUB22*」、「*PUB23*」、「*PUB24*」に着目し、これらの遺伝子が、MAMPsが誘導する防御反応で、どのような役割を持つのかを調べました。細菌のべん毛由来のMAMPを植物に与えると、*PUB22*、*PUB23*、*PUB24*遺伝子のいずれも1時間以内という早い時間で遺伝子発現が誘導されました。

また、病原菌が感染した場合に、これらの遺伝子が、植物のどの部分で発現するかを解析しました。3つの遺伝子それぞれからプロモーター^{*7}を取り出し、レポーター遺伝子^{*8}の*GUS*につないだ形質転換シロイヌナズナを作成しました。この植物

では*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子が発現した細胞が青く染まります。このシロイヌナズナに対し、植物病原菌の、べと病菌^{*9}を感染させたところ、菌糸の通り道に沿って細胞が青く染まりました（図 1）。このことから、病原菌が触れたり感染した細胞で*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子が活発に働くことがわかりました。

さらに、これらの遺伝子の変異体を取得し、掛け合わせの手法を使って 3 つの遺伝子すべてに変異を持つ 3 重変異体を作成しました。この 3 重変異体を用いて、MAMPs に対する防御応答を野生型のシロイヌナズナと比較し、*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子の機能を解析しました。野生型のシロイヌナズナでは、MAMPs にさらされると、活性酸素生成や防御遺伝子の発現誘導が起こります。興味深いことに、3 重変異体は、異なった種類の MAMP に対する防御応答を野生型より強く誘導しました。また、3 重変異体は、トマト斑葉細菌病菌に対する抵抗性が野生型より約 32 倍に上昇していました（図 2 左）。さらに、べと病菌に対する抵抗性も上昇していました（図 2 右）。これらの結果から、*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子は、細菌、卵菌など外敵の種類によらず、ユビキチン化反応を介して自然免疫能を抑制するブレーキ役として働く機能を持っていることが判明しました（図 3）。

3. 今後の期待

今回の研究から、植物は、自然免疫能を適度に抑えるブレーキを持っていることがわかりました。感染の初期過程では、病原菌に由来する MAMPs が細胞表面のパターン認識受容体によって検出され、細胞内情報伝達系によって、感染シグナルが核や細胞質に伝わり防御遺伝子の発現などが起こります。*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子の 3 重変異体では、MAMPs に対するほぼすべての防御反応が強くなっていることから、細胞内情報伝達系の初期過程や共通経路の制御に関与していると予想されます。さらに、*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子はユビキチン連結（E3）酵素であることから、標的タンパク質のユビキチン化を介して役割を果たしていると考えられます。今後、標的タンパク質が明らかになると、MAMPs の情報伝達において重要な役割を担うタンパク質の同定につながることを期待できます。また、通常の生育条件では、3 重変異体は野生型と背丈など何ら違いが認められないことや細菌やカビ由来の MAMP にも強い防御応答を示したことから、今後の作物育種において、収量の減少を抑えながら、広範囲の病原菌に対する耐病性が向上した品種を育種できる可能性が期待できます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 横浜研究所
植物科学研究センター 植物免疫研究チーム
チームリーダー 白須 賢 (しらすけん)

Tel : 045-503-9574 / Fax : 045-503-9573

横浜研究推進部 企画課

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 MAMPs (microbe-associated molecular patterns)

キチン、フラジェリン、リポ多糖など、広範囲の微生物に存在する一方、高等動植物には存在しない分子。PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)とも呼ばれる。動植物による微生物の検出において、目印として利用される。

※2 パターン認識受容体

細胞表面にある受容体タンパク質で、種々の MAMP を認識して自然免疫を作動させる。動物や昆虫では Toll 様受容体が知られている。植物では受容体キナーゼタンパク質がパターン認識受容体として同定される場合が多い。

※3 受容体キナーゼ

情報伝達にかかわる受容体の1種で、シグナルとなる分子と結合する部分と、タンパク質をリン酸化する酵素(タンパクキナーゼ)の部分の併せ持つ。通常、この2つの構造は、細胞膜を隔てて外側と内側に位置している。

※4 ユビキチン化反応

標的タンパク質に対するユビキチンを付加する反応系のこと。ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、さらにユビキチン転移酵素(ユビキチンリガーゼ、E3)によって行われる。ユビキチンは76アミノ酸からなるタンパク質で、真核生物で進化的に保存されており、配列の相同性が非常に高い。

※5 26S プロテアソーム

ユビキチンにより標識されたタンパク質を分解する巨大なタンパク質複合体で、真核生物や古細菌に存在する。プロテアソームで分解されるタンパク質にはユビキチンが重合され、これがプロテアソームによって認識される。ユビキチン付加反応を触媒するのが、E1, E2, E3 からなる酵素反応系である。ユビキチン-プロテアソームによるタンパク質分解系は、その重要性から発見者であるアーロン・チカノーバー(Aaron Ciechanover)、アブラム・ハーシュコ(Avram Hershko)、アーウィン・ローズ(Irwin Rose)の3博士に、2004年ノーベル化学賞が贈られた。

※6 エンドサイトーシス

細胞が細胞外の物質(低分子やタンパク質など)を細胞膜で取り囲み、細胞質内に取り込む作用のこと。細胞が取り込もうとする物質の多くは大きな極性分子であることから、疎水性の細胞膜を通過することができない。そのため細胞は、エンドサイトーシスによって物質を取り込む。最近の研究から、植物でも、パターン認識受

容体の FLS2 が、リガンド依存的にエンドサイトーシスによって細胞質内に取り込まれることが明らかにされている。

※7 プロモーター

一般には、遺伝子の転写領域上流に存在する転写調節に関わる情報を含んだ DNA 鎖部分。プロモーターには、遺伝子発現にかかわるさまざまな情報が含まれている。これらは主に、転写因子の結合配列の有無や組み合わせ、転写因子を含めた複数の DNA 結合タンパク質の相互作用により決定づけられる。

※8 レポーター遺伝子

解析したい遺伝子が発現しているかどうか簡便に定量、検出および細胞レベルで可視化する目的で利用される遺伝子のこと。遺伝子組み換え技術により、目的の遺伝子のプロモーター下流に連結した融合遺伝子を作り、遺伝子発現を解析する。*GUS* (β-グルクロニダーゼ)、*GFP* (緑色蛍光タンパク質)、*CAT* (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) などがある。

※9 べと病菌

卵菌のうち、ツユカビ科に属する植物病原菌。分類的には藻類に近縁である。湿度が高い時期に蔓延しやすく、アブラナ科やブドウなどつる植物の栽培において被害が多い。葉などに褐色の斑点として病徴が現れ、進行すると孢子嚢を形成する。

べと病菌に感染した本葉 拡大した感染部

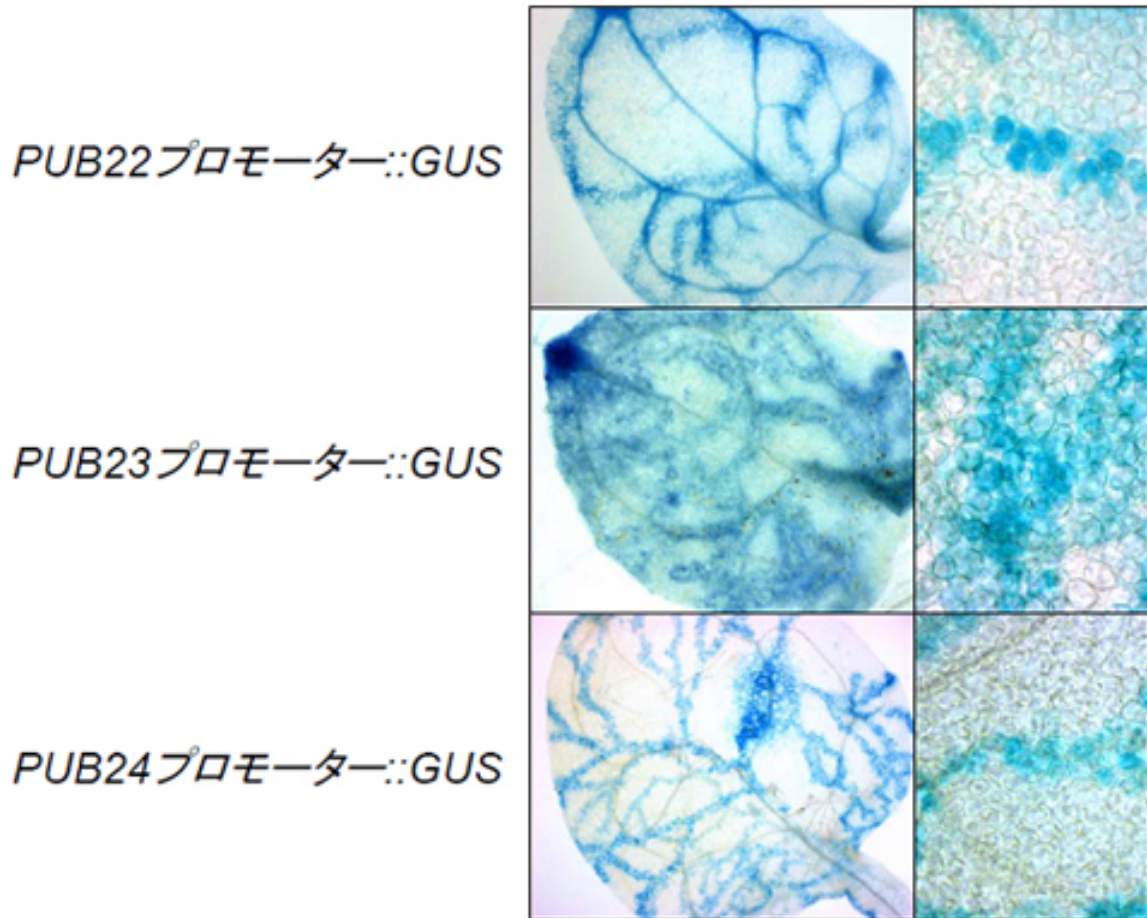
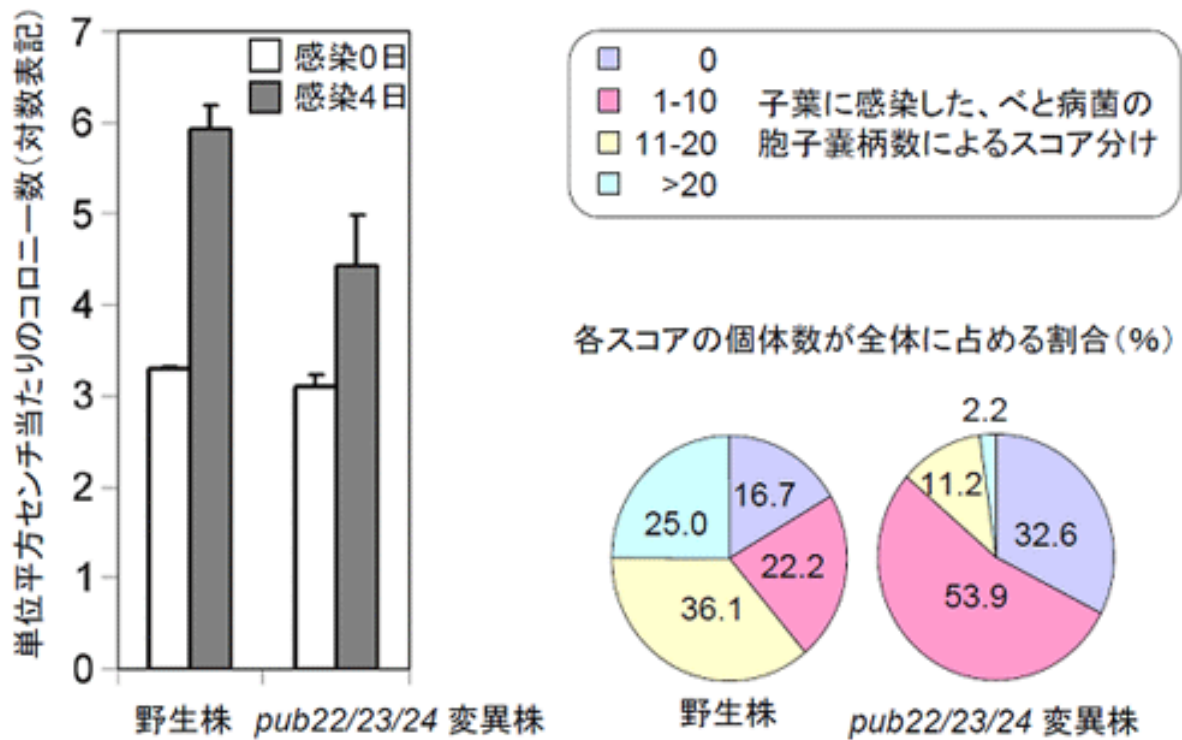


図1 *PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子の発現部位解析

PUB22、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子それぞれからプロモーターを取り出し、*GUS* レポーター遺伝子につないだ形質転換シロイヌナズナにべと病菌を感染させ、*PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子の働く細胞を可視化した結果。べと病菌糸の通り道に沿って細胞が青く染まった。



A. トマト斑葉細菌病菌に対する抵抗性試験 B. ペと病菌に対する抵抗性試験
 図2 pub22、pub23、pub24 変異株の病害抵抗性試験

感染4日後の本葉1 cm²あたりのトマト斑葉細菌病菌数の平均が、pub22/pub23/pub24 変異株では約26,900、一方野生株では約850,000だった（図では原著論文に従い対数表記）。つまり、pub22/pub23/pub24 変異株では野生株より抵抗性がおよそ32倍に上昇した（A）。また、ペと病菌に対しては、感染7日後の胞子嚢柄数に基づいた抵抗性試験結果でも、pub22/pub23/pub24 変異株が野生株より強い抵抗性を示した（B）。

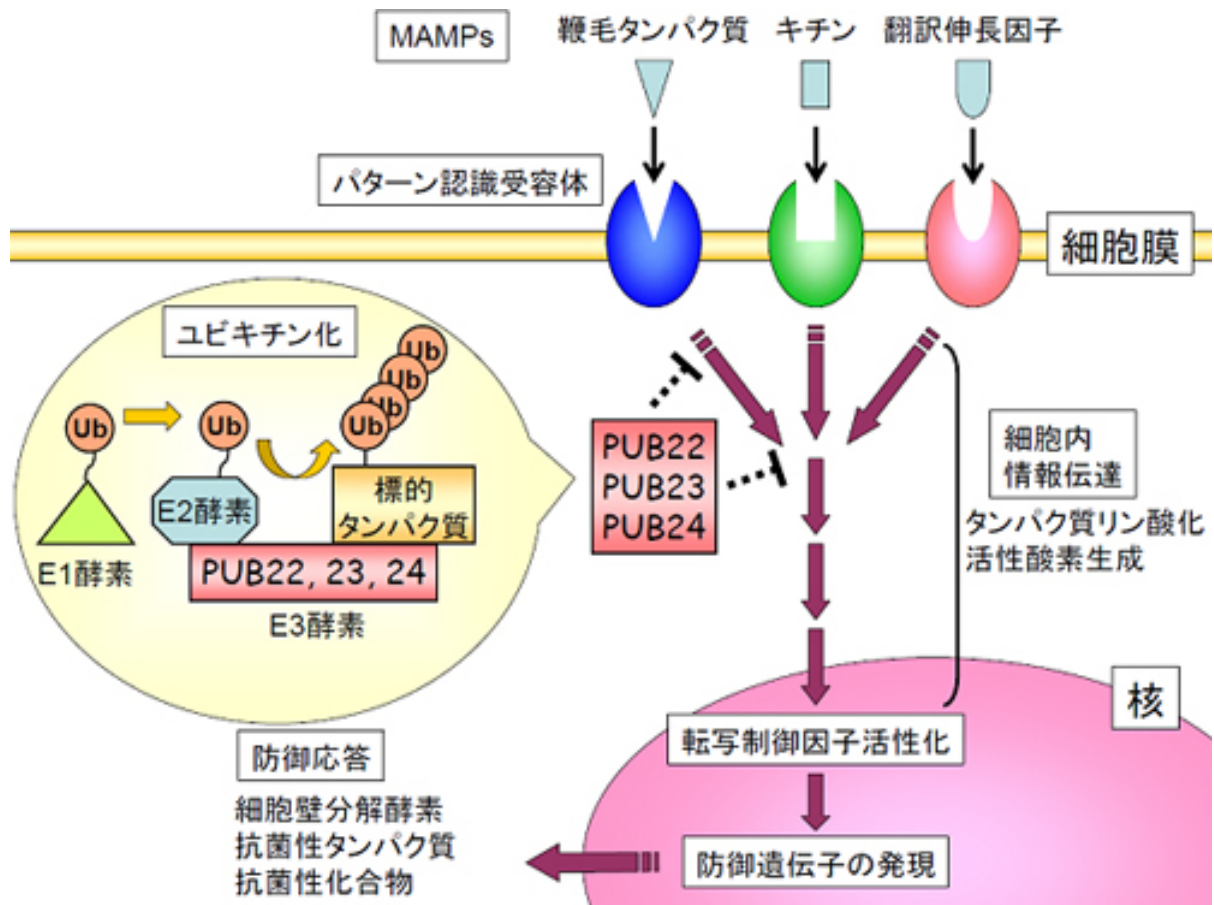


図3 *PUB22*、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子の働き

PUB22、*PUB23*、*PUB24* 遺伝子は、ユビキチン化反応を介して自然免疫能を抑制するブレーキ役として働いている。これら遺伝子の3重変異体は、べん毛タンパク質やキチン由来のMAMPに対して、共に強い防御反応を示したことから、MAMPの情報伝達におけるごく初期の段階や共通経路を抑制している可能性が考えられる。

(Ub : ユビキチン)