



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Studies on the Role of Regions Commonly Found
in *Xanthomonas* spp.

| | |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: ALFREDO GRZYCIUK ALMEIDA メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12099/2522 |

| | |
|------------|--|
| 氏名（国籍） | ALFREDO GRYCIUK ALMEIDA（ブラジル） |
| 学位の種類 | 博士（農学） |
| 学位記番号 | 農博甲第181号 |
| 学位授与年月日 | 平成12年3月14日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科及び専攻 | 連合農学研究科 生物環境科学専攻 |
| 研究指導を受けた大学 | 静岡大学 |
| 学位論文題目 | Studies on the Role of Regions Commonly Found in <i>Xanthomonas</i> spp. |
| 審査委員 | 主査 静岡大学教授 露無慎二 副査 信州大学教授 大政正武 副査 岐阜大学教授 百町満朗 副査 静岡大学助教授 瀧川雄一 |

論文の内容の要旨

カンキツかいよう病菌(*Xanthomonas citri*)の発病遺伝子(*pthA*)の翻訳産物(PthA)には、中央部に34個のアミノ酸からなるペプチドを一単位として17.5個タンデムに繋がった繰返し配列と、それに続く核局在性配列(自身が核内に移行するために必要な配列)が存在するが、本遺伝子を単独で宿主植物細胞内で発現させると(Transient expression)、かいよう症状が見られるようになることが報告されている。本論文は、これらの特徴から発病機構を予測し、それに関与する植物側の因子を発見し、この基本構造を明らかにしたものである。

申請者は宿主植物細胞内にPthAと結合する物質が存在することを予測し、まず、PthAの大腸菌内大量発現系を構築し、これを活用して得た純化PthAを固定化した生体分子間相互作用検出システム(Iasis)を用いてカンキツ葉内粗抽出液との相互作用の有無を調べた。その結果、硫酸アンモニウム塩析分画にその活性が存在することを見い出している。そこで、申請者は、PthAを固定化したアフィニティークロマトグラフィーを用いて、ストレス下で栽培したカンキツ葉粗抽出液よりPthA結合蛋白質の純化を試み、3種の蛋白質の純化に成功している。さらに、抗PthAモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、3種の内2種の蛋白質がPthAに特異的に結合すること、他の植物ではこのような特異的結合蛋白質が存在しないことを確認している。次に、この2種PthA結合蛋白質の内25 kDの蛋白質のN末端アミノ酸配列を決定し、このアミノ酸配列が病態リグニン合成に関与するCCoAMT(Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase)によく保存されていることを見い

出している。そこで、この N 末端アミノ酸をコードする DNA 混合オリゴマーを合成し、これを一方のプライマーとし、各種 CCoAMT で保存された C 末端部を他方のプライマーとして、PCR 法で増幅した後、増幅断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより、25 kD 結合蛋白質の相同領域をカンキツ葉よりクローニングすることに成功している。さらに、得られたクローンの DNA 塩基配列を決定した結果、種々植物で報告されている CCoAMT の塩基配列と高い相同性を示すことを明らかにしている。

また、申請者は、カンキツかいよう病菌接種部のリグニン染色を用いた光学顕微鏡による組織学的観察を行い、病斑部細胞周辺（細胞間隙）にリグニンが集積されていることを見出ししている。これらの結果から、申請者は PthA が CCoAMT と結合することにより、病態リグニン合成が変化し、細胞肥大に導き、その結果、かいよう症状を呈するようになるという仮説を提唱している。

なお、植物病原細菌による発病機構として、従来、発病因子を植物細胞外に分泌し、植物細胞外より危害を加えると考えられていたので、本発病機構は全く新しい発病機構の発見と言え、今後の病害抵抗性細胞育種や新しい防除法の開発に重要な示唆を与えるものである。また、*pthA* は多くの *Xanthomonas* 属細菌の非病原力遺伝子 (avirulent gene, *avr*) と 90% 以上の高い相同性を示すことが知られており、本発見は、*Xanthomonas* 属細菌に対する品種レベルの抵抗性発現機構の開明にも重大な示唆を与えるものである。

審 査 結 果 の 要 旨

主査及び副査の 4 名は、学位論文の査読を行った後、平成 12 年 1 月 25 日に学位申請者の口頭発表に活発な質疑応答を行った。

本論文は、植物病原細菌であるカンキツかいよう病菌 *Xanthomonas citri* の病原性遺伝子 PthA を宿主植物内で発現させると、細胞肥大をおこし、かいよう症状を呈するようになる事に着目し、この遺伝子による発病機構解明に導く、重要な発見をしている。

申請者は、まず、宿主植物細胞内に本遺伝子翻訳産物 (PthA) と結合する物質が存在することを生体分子間相互作用検出システムを用いて発見している。そこで、申請者は、PthA を固定化したアフィニティークロマトグラフィーを用いて、PthA 結合蛋白質の純化を試み、これに成功している。この純化蛋白質の PthA への結合が特異的であることを、抗 PthA モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認している。次に、本 PthA 結合蛋白質の N 末端アミノ酸配列を決定し、このアミノ酸配列が病態リグニン合成に関与する CCoAMT (Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase) によく保存されていることを見出ししている。次に、この N 末端アミノ酸をコードする DNA 混合オリゴマーを合成し、これを一方のプライマーとし、CCoAMT の C 末端部を他

方のプライマーとしてPCR法で増幅した後、増幅断片プローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより、この相同領域をクローニングすることに成功している。得られたクローンのDNA塩基配列を決定したところ、種々植物で報告されているCCoAMTと高い相同性を示すことが明らかになった。また、本論文では、カンキツかいよう病菌接種部における組織学的観察から、病班周辺部にリグニンが集積されていることを見い出している。これらの結果から、申請者はPthAがCCoAMTと結合することにより、病態リグニン合成が変化し、かいよう症状に導く可能性を示唆している。

以上のごとく、本論文は、植物病原細菌による新しい発病機構を分子生物学的手法を用いて明らかにしたものであり、十分な独創性があり、学術的価値が高いものであるといえる。また、審査委員の質問等には、全て独自の解釈も含めながら的確に答えたことから、岐阜大学大学院連合農学研究科の学位を得るために十分な条件を備えていると審査委員全員一致で認めた。

基礎となる学術論文：

Gryciuk, A. A., K. Sayama and S. Tsuyumu (2000). Isolation of a Protein Bound to Canker Forming Factor from Citrus Plant. Ann. Phytopathol. Soc. Japan (in press).

Gryciuk, A. A. and S. Tsuyumu (2000) Cloning of a Genomic DNA Encoding Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase of Citrus, Ann. Phytopathol. Soc. Japan (in press).