

令和元年6月15日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07668

研究課題名(和文) 病原菌の“狡猾さ”を酵母と構造で解く：病原菌エフェクターの宿主内活性化機構の解析

研究課題名(英文) Elucidation of Activation Mechanism of Pathogen Effector Proteins by Yeast Genetic System and Structural Analysis

研究代表者

田淵 光昭 (Tabuchi, Mitsuaki)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：00294637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：病原菌の多くはエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内に注入することによりその病原性を発現する。本研究で、我々は植物病原性細菌青枯病菌由来のエフェクターRipAYとRipAAについて宿主因子に依存した活性化メカニズムについて解析した。その結果、RipAYは宿主内活性化因子であるチオレドキシシンと1:2の分子比で複合体を形成することを明らかにした。また、RipAAについては、RipAAが膜局在化ドメイン、自己阻害ドメイン、増殖阻害ドメインからなるマルチドメインタンパク質であることを明らかにし、RipAAの活性化には形質膜への局在化とそれに伴うリン酸化が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト及び植物に感染する病原菌は、エフェクターを宿主細胞内に注入することにより宿主内の免疫機能を阻害することで感染を成立させている。エフェクターの多くは、宿主細胞に注入されることでその活性を宿主内因子により活性化されることが知られており、これはエフェクターの活性により病原菌自身の増殖が阻害されないためにも有効であり、また、宿主内においてその活性を時間的・空間的に制御されることで効率的に感染を引き起こしていることが考えられる。本研究によってこれらのエフェクターの宿主依存的な活性化メカニズムの一旦を明らかにすることができ、病原菌の感染戦略の理解に繋がる成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：Many bacterial pathogens express their virulence by injecting the effector proteins into host cells. In this study, we investigated the host factor-dependent activation mechanism of the effector RipAY and RipAA derived from the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. As a result, it was revealed that RipAY formed a complex with thioredoxin, which is a host activating factor, at a molecular ratio of 1:2. In addition, we found that RipAA is a multi-domain protein consisting of a membrane localization domain, an autoinhibitory domain, and a growth inhibitory domain. It also clarified that RipAA was activated by phosphorylation via the plasma membrane targeting.

研究分野：応用微生物学

キーワード：エフェクター 青枯病菌 出芽酵母 型分泌装置

1. 研究開始当初の背景

多くのグラム陰性病原性細菌は、エフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞中に型分泌装置を使って注入することが知られている。エフェクターは宿主細胞内の様々な細胞機能を阻害することにより宿主免疫応答を攪乱することで感染に有利な環境の構築に機能している。しかし、エフェクターの多くは宿主との相互作用の過程で独自に進化、獲得されたと推定されるものが多く、一次構造から機能を推定することが困難な状況にある。

酵母は単細胞真核生物であり、細胞機能の多くが高等真核生物と類似していることが知られており、これまで真核生物のモデルとして広く用いられてきた。エフェクターの一部は、酵母で発現させるとエフェクター標的の酵母カウンターパートに作用することで酵母に増殖阻害等の表現型を引き起こすことが示されており、エフェクター機能の解明に酵母発現系が有用であることが証明されている。

青枯病菌は、ナス科植物をはじめとする 200 種以上もの植物に感染し、枯死させる農業上最も深刻な被害をもたらす植物病原性細菌の一つであり、その宿主域の広さに対応して 70 種類以上もの多くのエフェクターを有する。青枯病菌は、ナス科植物を含む 200 種以上もの植物に感染することで枯死させる農業上重要な病原菌である (ジャガイモだけでも年間 1,000 億円以上の被害)。

我々は、青枯病菌エフェクター 38 個を酵母に過剰発現させたところ、8 個のエフェクターが酵母に増殖阻害を引き起こすことを見出した。これまでにこれら 8 個のエフェクターの中で RipAY と RipAA という 2 つの機能未知エフェクターに焦点を絞って研究を進めてきた。RipAY は、モチーフ検索の結果、大腸菌からヒトにまで保存された ChaC ドメインと呼ばれる機能未知ドメインを有していた。最近、ヒトおよび酵母 ChaC タンパク質である Chac1 および Gcg1/Yer163c がグルタチオン(GSH)を特異的に分解する γ -glutamyl cyclotransferase (GGCT)活性を有すること(Kumar *et al.*, 2012, *EMBO rep*)が報告され、RipAY もこれら ChaC タンパク質同様に GGCT 活性を有することが予期された。実際、酵母で発現させた RipAY は、酵母 Gcg1 よりも遥かに高い GGCT 活性を有していた。また、RipAY を過剰発現させた酵母は細胞内 GSH がコントロールと比べて 30%程度にまで減少していた。さらに推定活性中心変異体(E216Q)では GGCT 活性の消失及び細胞内 GSH の回復に伴い、増殖阻害の回復が見られた。植物において GSH は病原菌に対する防御免疫に不可欠であり、本結果から RipAY は、宿主細胞内 GSH を標的として病原性を発揮する新規なエフェクターであることが明らかとなった (Fujiwara *et al.*, 2016, *J Biol Chem*, 図 1 上段)。大腸菌で発現させた組換え RipAY タンパク質は、全く GGCT 活性を示さなかった。しかし、驚いたことに組換え RipAY タンパク質に酵母抽出液を添加することにより GGCT 活性の上昇が確認された。これより、酵母抽出液中には RipAY 活性化因子が存在することが考えられた。そこで、酵母抽出液から RipAY 活性化因子を精製したところチオレドキシン(Trx)が同定された。興味深いことに RipAY は、複数ある植物 Trx (Arabidopsis では 19 個)の中でも病原菌感染時に特異的に発現が上昇する Trx-h5 により最も効率よく活性化された。これより、青枯病菌は、宿主への感染時に宿主免疫応答依存的に発現する Trx-h5 を利用して効率よく RipAY を活性化させ、宿主細胞内 GSH を枯渇させることで宿主防御免疫を破綻させるというモデルが考えられた。

一方、RipAY 同様に酵母増殖阻害を指標にして単離された RipAA は、青枯病菌の宿主域を決定する非病原力遺伝子 (この遺伝子があるために非宿主に感染できなくなる)AvrA として報告されていたが、分子機能は不明であった。酵母を用いた解析から RipAA は、酵母細胞内において形質膜特異的に局在し、Casein kinase I により特異的にリン酸化されることでその機能を獲得していることが考えられた (図 1 下段)。また、各種欠失変異体を用いた解析により RipAA の N 末端に膜局在化ドメインが、C 末端に酵母増殖阻害に機能するドメイン(GID)が存在し、それらの中には GID の機能を抑制する自己阻害ドメイン(AID)を持つマルチドメインタンパク質であることが推定された。

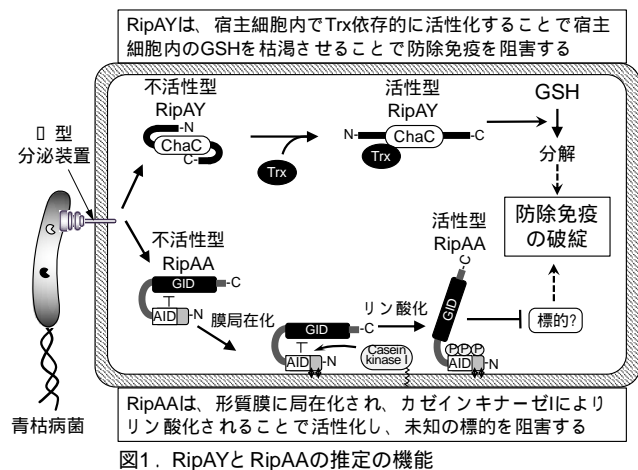


図1. RipAYとRipAAの推定の機能

2. 研究の目的

本研究で我々は、RipAY が如何にして宿主 Trx 依存的に GGCT 活性を獲得するのかを構造解析により分子レベルで明らかにすること、また、形質膜に局在することで宿主キナーゼにより活性化する機能未知エフェクターRipAA の酵母遺伝学を用いた分子機能の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母発現系による RipAY および RipAA の機能解析

構造予測により推定された RipAY および RipAA の機能を元に各種変異体を作製し、これら変異体の機能についてガラクトース誘導性プロモーター(*P_{GAL1}*)を用いた酵母発現系を用いて、発現誘導時と非誘導時の増殖をスポットアッセイにより評価した。

(2) 大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現

RipAY および RipAY 活性化因子として同定された青枯病菌、酵母、植物由来チオレドキシシン(Trx)を大腸菌発現ベクターpET23d もしくは pDEST17 に組み込み、大腸菌 Rosetta gami B (DE3) pLysS 株においてヒスチジントグ融合タンパク質として発現させ、Ni-キレートカラムを用いて精製した。精製後のタンパク質は microBCA アッセイにより定量した。

(3) グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)活性の測定

GGCT 活性は、グルタチオン(GSH)を基質として GGCT 活性により遊離した Cys-Gly ジペプチドを酵母 Cys-Gly ジペプチドペプチダーゼ Dug1 を用いた反応により最終的に遊離したシステインを酸性ニンヒドリンにより検出し、遊離したシステイン量を基に活性を測定した。

(4) Yeast two hybrid 法による RipAY と Trx との相互作用解析

RipAY 各種変異体を pGBK T7 ベクターに組み込み、Trx-h3 を pGAD T7 ベクターに組み込み、これらプラスミドを酵母 AH109 株に形質転換し、ヒスチジン要求性を回復を指標に RipAY 各種変異体と Trx-h3 との相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) RipAY の機能ドメインの解析

RipAY は、通常細胞内で恒常的に GGCT 活性を有し、細胞質でのグルタチオン代謝に関わる ChaC タンパク質とは異なり、活性発現に必須な ChaC ドメインに加えて、N 末端および C 末端に伸張領域を持っている。そこで、N 末端および C 末端から各種欠失変異体を作製した(図 2A)。作製した各種欠失変異体を酵母発現ベクターに組み込み、酵母で過剰発現させたところ、N 末端から 83 アミノ酸残基まで欠失させた変異体は増殖阻害活性を有していたが、N 末端から 90 アミノ酸残基以上欠失させた変異体は、増殖阻害活性を失った。一方、C 末端からの欠失変異体では、C 末端から 24 アミノ酸残基欠失させても増殖阻害には影響なかったが、C 末端から 33 アミノ酸残基以上欠失させると増殖阻害活性を失った(図 2B)。これより、RipAY はその機能発現に少なくとも 83-394 アミノ酸残基が必要であることが明らかになった。酵母内での各種欠失変異体の発現は抗 GFP 抗体により検出した(図 2C)。

次に Yeast two hybrid 法により Trx-h3 との RipAY 各種欠失変異体の相互作用を調べたところ、Trx-h3 との相互作用は増殖阻害活性と相関性が見られた(図 3)。

以上の結果より、RipAY は少なくとも 83-394 アミノ酸残基を介して Trx と相互作用し、GGCT 活性を獲得していることが明らかとなった。

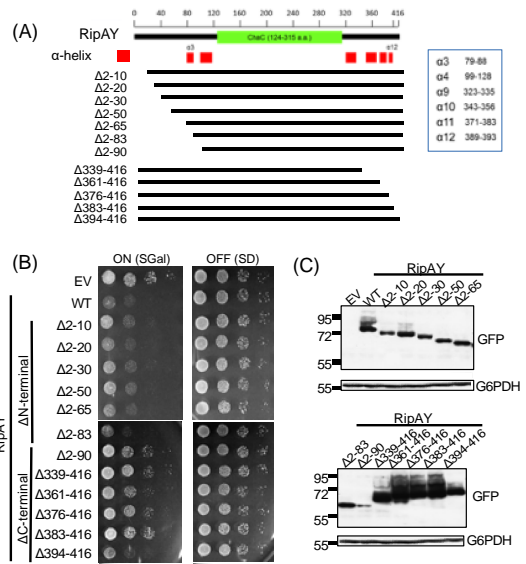


図1. RipAY機能ドメインの解析

(A) RipAYをN末端、C末端からそれぞれ欠失させた変異体を作製した。
(B) RipAY各種欠失変異体を酵母で発現させ、増殖阻害活性を調べた。
(C) RipAY各種欠失変異体のウエスタンブロッティングにより検出した。

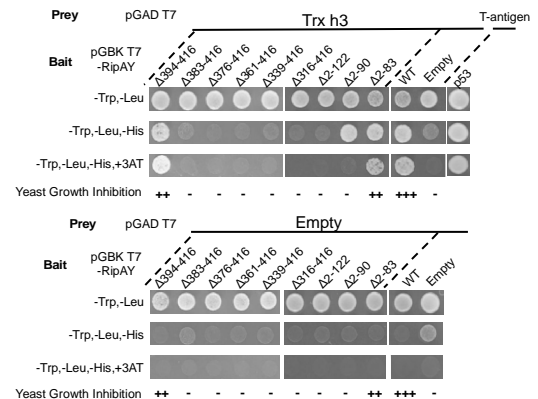


図3. Yeast two hybrid法による RipAYと Trx-h3との相互作用解析

RipAY は、Trx-h5 と相互作用することで活性化するが RipAY 分子内にある唯一の Cys 残基を変異させてもその Trx による増殖阻害活性や Trx との相互作用には影響がない。これより、Trx-h5 は、活性中心 Cys 残基を介さずに RipAY を活性化することが示唆された。そこで、Trx-h5 の活性中心にある活性発現に必須な 2 つの Cys 残基 (C39 と C42) をそれぞれ単独もしくは両方を変異させた変異体を作製し、大腸菌で組み換えタンパク質を調製後、同じく大腸菌で発現させた RipAY と混合することで *in vitro* での GGCT 活性の活性化を測定した。その結果、Trx-h5 の 2 つの活性中心 Cys 残基を両方 Ser 残基に変異させた変異体 (C39, 42S) は、著しく RipAY の活性可能を失っていたが、僅かには活性可能を維持していた。一方、Cys 残基のいずれかの変異体 (C39S または C42S) では、野生型の Trx-h5 と比較して GGCT 活性可能は 3 分の 1 程度に減少した。これらの結果から Trx の活性中心 Cys 残基は、RipAY の GGCT 活性化には必須ではないが、おそらく RipAY が Trx と相互作用するための構造形成に重要であることが示唆された。

RipAY と Trx-h5 との複合体の結晶構造を明らかにするため、大腸菌を用いて一段階で複合体を形成させ、精製する方法を確立した。T7 プロモーターの下流に Trx-h5 遺伝子と RipAY 遺伝子を組み込み、そしてリボゾーム結合部位をそれぞれの遺伝子上流に配置したプラスミド (pET23d-Trx-h5-RipAY plasmid) を構築した (図 4A)。本プラスミドを大腸菌 Rosetta gami B pLysS 株に形質転換し、IPTG で誘導後、大腸菌内で両方のタンパク質を発現させることで大腸菌細胞内で複合体となった RipAY-Trx-h5 複合体タンパク質を精製することができた。

この複合体タンパク質を SDS-PAGE で分離し、同じく大腸菌で発現した RipAY および Trx-h5 組み換えタンパク質を RipAY:Trx-h5=1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1.5, 1:6 の比率で混合したタンパク質溶液を標準サンプルとして分離し、分離後の SDS-PAGE を Sypro Ruby で染色することで蛍光により検出し (図 4B)、検出した蛍光強度を指標に検量線を作成し、検量線をもとに回帰分析により RipAY-Trx-h5 複合体タンパク質の RipAY-Trx-h5 の存在比率を求めた (図 4C)。その結果、蛍光強度から Trx-h5/RipAY=2.01±0.18 と算出された。これより、RipAY-Trx-h5 複合体は RipAY が 1 分子あたり、Trx-h5 が 2 分子存在することで複合体が形成されていることが推測された。

RipAY-Trx-h5 複合体が精製できたので、結晶構造解析を行うため、本複合体タンパク質を大腸菌から 10 mg/mL の濃度で約 1 mL を精製し、200 種類以上の各種条件で結晶の作製を試みたが、現在のところ結晶を得るに至っていない。今後、更に結晶調製条件を検討することで結晶を作製し、複合体の結晶構造解析を試みる。

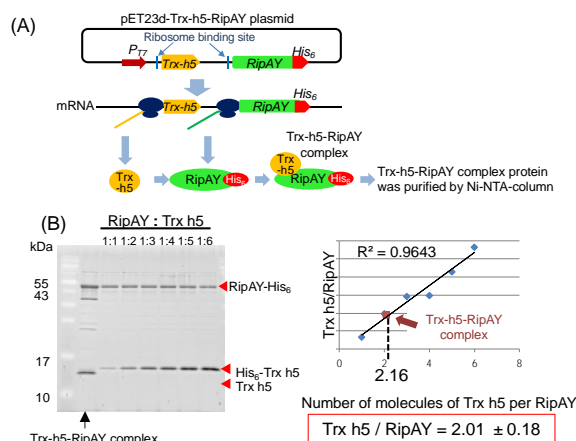


図4. RipAY-Trx-h5複合体タンパク質の精製
(A) Trx-h5遺伝子と RipAY遺伝子を同一のプラスミド上に組み込み同時発現させることで複合体を精製した。
(B) RipAY-Trx-h5複合体タンパク質のSDS-PAGEで分離し、蛍光染色し、各種モル比で混合したTrx-h5, RipAYの蛍光強度からRipAY-Trx-h5のそれぞれのタンパク質の比率を計測した。

(2) RipAA 活性化メカニズムの解析

RipAA は、230 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、一次構造情報から既存のドメイン等は見いだせない機能未知遺伝子である。RipAA の機能ドメインを明らかにするため Phyre2 server による二次構造予測を行い、予測された α -ヘリックスおよび β -シート構造単位で N 末端および C 末端から各種欠失変異体を作製した。作製した変異体を GFP 融合ができる酵母ガラクトース誘導性発現ベクターに組み込み、得られたプラスミドを酵母に形質転換し、過剰発現による増殖阻害と細胞内の局在を解析した。

野生型 RipAA は、酵母内では娘細胞膜に特異的に局在するが、N 末端から 9 アミノ酸残基欠失させるとその局在は細胞質へと変化し、増殖阻害活性も見られなくなった。興味深いことにさらに 28 アミノ酸残基まで欠失させると再度増殖阻害活性が見られるようになったが、局在は細胞質のままであった。そして、更に N 末端から 78 アミノ酸残基以上欠失させることで完全に増殖阻害活性を失った。一方、C 末端から 14 アミノ酸欠失させても増殖阻害、細胞内局在には影響なかったが、44 アミノ酸残基以上欠失させることで増殖阻害を完全に失った。C 末端からの欠失では増殖阻害を失っても細胞内局在は、44 アミノ酸残基欠失させたものは娘細胞膜に局在し、46 アミノ酸残基から 95 アミノ酸残基の欠失までは形質膜全体に局在が見られ、さらに 123 アミノ酸以上欠失させると形質膜と細胞質の両方に局在が見られるようになった。これらの結果から、RipAA は、N 末端側に膜局在化ドメインを有し、C 末端側に増殖阻害に關与するドメインを有していることがわかった。また、N 末端から 9 アミノ酸残基欠失させると一旦増殖阻害は回復したことから N 末端から 20 アミノ酸残基付近には自己の増殖阻害活性を負に制御する自己阻害ドメインを有することが推測された。この様に RipAA は、3 つの異なる機能ドメインから構成されるマルチドメインタンパク質であることが明らかになった。

RipAA は酵母細胞内において形質膜に局在するが、増殖阻害活性には膜局在は、必ずしも重

要でないことが上記の欠失変異体の解析で明らかになった。N 末端から約 20 アミノ酸残基付近には自己阻害ドメインが存在することが示唆され、この領域付近では膜局在時に高度にリン酸化されることがわかった。また、このリン酸化には酵母において形質膜に局在するタンパク質リン酸化酵素であるカゼインキナーゼ I が関与していることを明らかにした。これらの結果から、RipAA は膜に局在することでカゼインキナーゼ I によりリン酸化を受けることで活性化をするという仮説を立てた。そこで、この仮説を検証するために細胞質に局在が変化し、増殖阻害活性を失った N 末端から 21 アミノ酸残基欠失させた RipAA^{Δ2-21} の N 末端側にパルミトイル化されることで形質膜に局在化

することが知られている酵母 Psr1 遺伝子の N 末端部分を融合することで強制的に形質膜へと移行させることでその増殖阻害活性が回復するかを調べた(図 5)。その結果、RipAA^{Δ2-21} 変異体は、細胞質に局在化し増殖阻害が見られなかったが、Psr1-RipAA^{Δ2-21} 融合タンパク質は、形質膜に局在し、再び増殖阻害が見られるようになった。また、コントロールとして作製した Psr1 のパルミトイル化に重要な Cys 残基を Ser 残基に置換した変異体 P_Spsr1^C S-RipAA^{Δ2-21} では、局在は細胞質

へと変化し、増殖阻害も再び見られなくなった。これらの結果から、RipAA は形質膜へと局在化することで活性化し、増殖阻害活性を獲得することが明らかとなった。

エフェクターの多くは、宿主細胞に注入されることでその活性を宿主内因子により活性化されることが知られており、これはエフェクターの活性により病原菌自身の増殖が阻害されないためにも有効であり、また、宿主内においてその活性を時間的空間的に制御されることで効率的に感染を引き起こしていることが考えられる。本研究によってこれらのエフェクターの宿主依存的な活性化メカニズムの一旦を明らかにすることができた。

今後は、RipAY については、Trx との複合体の結晶作製条件を検討し、最終的に結晶構造を明らかにすることで分子レベルでの活性化のメカニズムを明らかにする必要がある。また、RipAA については、本来の宿主である植物細胞内での RipAA の活性化のメカニズムや RipAA の増殖阻害活性を担う活性が何であるのか？を明らかにする必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. Popa, C., Li, L., Gil, S., Tatjer, L., Hashii, K., Tabuchi, M., Coll, N.S., Ariño, J., and Valls, M. The effector AWR5 from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* is an inhibitor of the TOR signaling pathway. 2016. Sci Rep. 査読有, 2016 Jul 20;6:73. doi: 10.3389/fcimb.2016.00073.w
2. Popa, C., Tabuchi, M., and Valls, M. Modification of bacterial effector proteins inside eukaryotic host cells. 2016 Front Cell Infect Microbio. 査読有, 2016 Jul 20;6:73. doi: 10.3389/fcimb.2016.00073. eCollection 2016. Review.
3. 藤原祥子, 田淵光昭. 植物病原菌の“狡猾さ”を酵母で解く: グルタチオンを分解するエフェクターの発見とその機能解析. 2016 化学と生物. 2016 54(12), 869-870.
4. Kisaki, G., Tanaka, S., Ishihara A., Igarashi, C., Morimoto, T., Kamano, K., Endo, A., Sugita-Konishi, S., Tabuchi, M., Gomi, K., Ichimura, K., Suezawa, K., Otani, M., Fukuda, T., Manabe, T., Fujimura, T., Kataoka, I. and Akimitsu, K., Evaluation of various cultivars of Actinidia species and breeding source Actinidia rufa for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3, 2018. J Gen Plant Pathol. 査読有, 2018, Nov 84(6), 399-406. doi: 10.1007/s10327-018-0804-5.

[学会発表](計 9 件)

1. Tabuchi, M., Fujiwara, S., Ohnishi, O., Popa, C., Valls, M., Genin, S., and Tanaka, N., *Ralstonia solanacearum* effector, RipAY exhibits robust γ -glutamyl cyclotransferase activity when stimulated by eukaryotic thioredoxins, The Sixth International Bacterial Wilt Symposium, 2016 年.

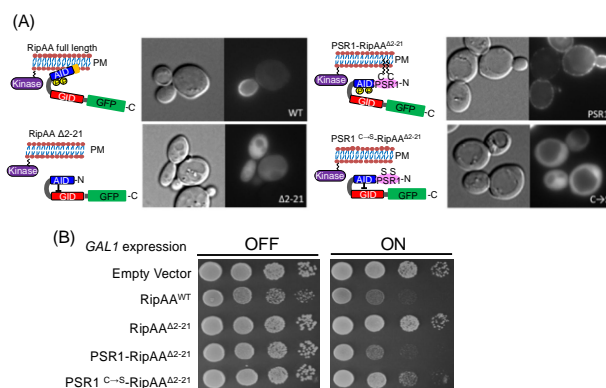


図3. 強制的膜局在化によるRipAAの活性化機構の解析

(A) RipAA WTは細胞膜に局在し、RipAA^{Δ2-21}変異体は、細胞質に局在する。RipAA^{Δ2-21}変異体に脂質修飾ドメインであるPsr1を融合し強制的に膜に局在化する。Psr1の脂質修飾部分のCysをSerに変異させた変異体は細胞質へと局在する。

(B) RipAA各種変異体の増殖阻害活性を調べたところ、強制的に膜に局在化させることで増殖阻害が見られた。

2. Kitasono, T., Shin, S., Tanaka, N., and Tabuchi, M., A plant pathogen effector, RipAA causes growth inhibition that is stimulated through membrane localization and subsequent phosphorylation in yeast, 14th International Congress on Yeasts, 2016 年.
3. Tabuchi, M., Functional analysis of plant pathogen effector proteins in yeast, Phytogene Symposium VIII, 2016 年.
4. 北園喬斗, 忻詩博, 田中直孝, 田淵光昭., 病原菌エフェクターの膜局在化に依存した活性化機構の解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年.
5. 北園喬斗, 白井沙樹, 藤原祥子, 田中直孝, 田淵光昭., 青枯病菌エフェクターRipAA による酵母増殖阻害と植物免疫への影響の解析, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会, 2017 年.
6. 池尻篤生, 藤原祥子, 林順司, 櫻庭春彦., 田中直孝, 田淵光昭., 青枯病菌エフェクター RipAY の宿主チオレドキシン依存的活性化機構の解析, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会, 2017 年.
7. 藤原祥子, 池尻篤生, 田中直孝, 田淵光昭., 植物病原菌エフェクターRipAY の宿主チオレドキシン依存的な活性化機構の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年.
8. Ikejiri, A., Fujiwara, S., Tanaka, N., Tabuchi, M., Functional analysis of the interaction between *R. solanacearum* effector RipAY and activator thioredoxin, Phytogene Symposium X, 2018 年.
9. Fujiwara, S., Tanaka, N., Tabuchi, M., *Acidovorax citrulli* putative effector, Aave_4606 exhibits glutathione degradation activity by thioredoxin from host plant, Phytogene Symposium X, 2018 年.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/mtabuchi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：櫻庭 春彦

ローマ字氏名：Haruhiko Sakuraba

所属研究機関名：香川大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90205823

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大西 浩平

ローマ字氏名：Kouhei Ohnishi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。