

令和元年6月18日現在

機関番号：85301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18659

研究課題名(和文) 病原菌エフェクターコレクションを活用した強度青枯病抵抗性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of bacterial wilt-resistance gene using *Ralstonia solanacearum* effector proteins

研究代表者

中野 真人 (Nakano, Masahito)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・JSPS特別研究員

研究者番号：60756708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌は200種類以上の植物を加害する植物病原細菌である。青枯病の防除においては病害抵抗性品種が利用されてきたが、遺伝的に同一な抵抗性品種の連続使用により、新たな病原性を獲得した菌株が出現し、甚大な被害を引き起こしている。本研究では、新たな抵抗性品種を作出するため、青枯病菌の認識に関わる抵抗性タンパク質を同定することを目的とした。ナス科のモデル植物であるベンサミアナタバコに認識される青枯病菌エフェクターを探索したところ、防御応答を強く誘導するエフェクターとしてRipBを見出した。また、本エフェクターの認識に抵抗性タンパク質Roq1が関与す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

ベンサミアナタバコは青枯病菌のRipP1とRipAAを認識することで抵抗性を発揮すると従来考えられてきた。しかしながら、ripAA ripP1二重変異株はベンサミアナタバコに病原性を示さなかった。一方、ripB変異株は萎凋症状を誘導したことから、ベンサミアナタバコに認識される主要なエフェクターはRipBであることが明らかになった。この発見は従来の定説に対して再考を促す新知見といえる。

研究成果の概要(英文)： *Ralstonia solanacearum* is the causal agent of bacterial wilt in solanaceous crops. This pathogen injects approximately 70 effector proteins into plant cells via the Hrp type III secretion system. To identify an as-yet-unidentified avirulence factor possessed by *R. solanacearum*, we transiently expressed *R. solanacearum* effectors in *Nicotiana benthamiana* leaves and monitored their ability to induce effector-triggered immunity. The expression of RipB strongly induced the production of reactive oxygen species and the expressions of defense-related genes in *N. benthamiana*. The ripB mutant of *R. solanacearum* caused wilting symptoms in *N. benthamiana*. RipB shares homology with *Pseudomonas* HopQ1, which is recognized by the resistant protein Roq1. The RipB-induced resistance against *R. solanacearum* was abolished in Roq1-silenced plants. These findings indicate that RipB acts as a major avirulence factor in *N. benthamiana* and that Roq1 is involved in the recognition of RipB.

研究分野：植物保護科学

キーワード：青枯病 病害抵抗性 エフェクター 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、ナス科作物を中心に 200 種類以上の植物を加害する植物病原細菌である。青枯病の防除においては病害抵抗性品種が利用されてきたが、遺伝的に同一な抵抗性品種の連続使用により、新たな病原性を獲得した菌株が出現し、甚大な被害を引き起こしている。そのため、青枯病の防除に有効な抵抗性品種の開発が農業現場で強く求められている。

2. 研究の目的

植物は病害抵抗性タンパク質と呼ばれる細胞内受容体により病原菌の非病原力 (Avr) エフェクターを感知し、非常に強い防御応答を誘導する。本研究では、ナス科のモデル植物であるベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いて、青枯病菌の新規 Avr エフェクターの探索を行うとともに、このエフェクターを認識する抵抗性タンパク質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Avr エフェクターのスクリーニング

エフェクター遺伝子を植物発現用バイナリーベクターに連結し、アグロバクテリウムに導入した。このアグロバクテリウムを介してエフェクター遺伝子をベンサミアナタバコの本葉で一過的に発現させ、化学発光プロンプ L-012 を用いて活性酸素種 (ROS) の生成を検出した。

(2) エフェクター変異株の作出と病原性の評価

エフェクター遺伝子の周辺領域を相同組換え用ベクターに連結した。このベクターを大腸菌 S17-1 株を介して青枯病菌 RS1002 株に導入し、選択培地上でエフェクター変異株を選抜した。作出した変異株をベンサミアナタバコの茎に接種し、萎凋症状の有無と病徴の進展具合を経日的に観察した。

(3) 抵抗性遺伝子抑制植物の作出

抵抗性遺伝子の部分断片をウイルス誘導ジーンサイレンシング用ベクターに連結し、アグロバクテリウムに導入した。このアグロバクテリウムをベンサミアナタバコの幼苗に感染させ、抵抗性遺伝子抑制植物を作出した。

4. 研究成果

(1) Avr エフェクターの同定

青枯病菌の新規 Avr エフェクターを同定するため、植物の防御応答の一つである ROS の生成を指標とした Avr エフェクターのスクリーニングを実施した。アグロバクテリウムを介して青枯病菌 RS1000 株が有する約 70 種類のエフェクターをベンサミアナタバコの本葉で一過的に発現させ、ROS の生成が誘導されるかを調べた。その結果、ROS の生成を顕著に誘導するエフェクターとして RipB を見出した (図 1)。RipB が誘導する ROS の生成量は、既知の Avr である RipP1 と比較して約 2 倍多いことから、本エフェクターは RipP1 よりも強く認識されると考えられた。また、RipB はサリチル酸情報伝達経路のマーカージンを含む複数の防御関連遺伝子の発現を誘導した。これらの結果から、Avr エフェクターの候補として同定した RipB は、ベンサミアナタバコにおいて ROS の生成や防御関連遺伝子の発現といった防御応答を誘導することが明らかになった。

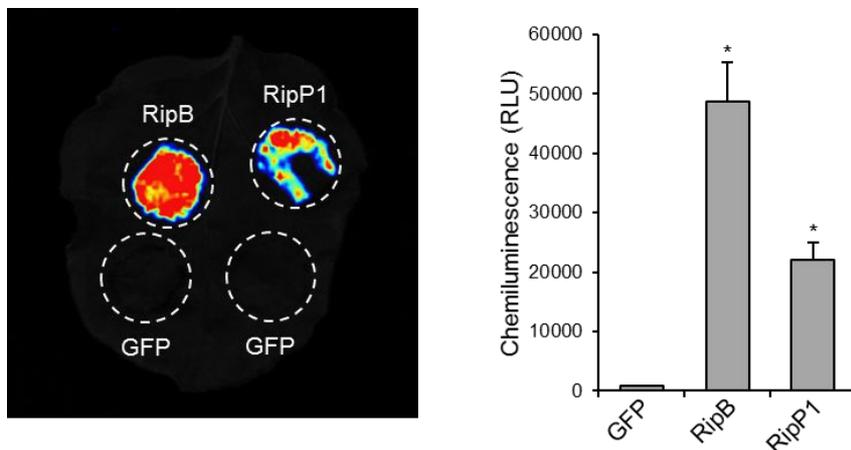


図 1. エフェクター発現時の ROS の生成

(2) RipB エフェクターの機能解析

RipB が Avr エフェクターとして機能するかを調べるため、青枯病菌 RS1002 株の *ripB* 変異株

を作出し、ベンサミアナタバコにおける表現型を観察した。野生株 (WT) を接種したベンサミアナタバコは接種 14 日後まで健全に生育し、萎凋症状は認められなかった (図 2)。一方、*ripB* 変異株を接種したベンサミアナタバコは接種 4 日後から萎凋症状が認められ、接種 11 日後に全ての接種個体が枯死した。この変異株に *ripB* を導入した相補株はベンサミアナタバコに対して病原性を示さなかった。なお、Avr エフェクターと従来考えられてきた RipAA と RipP1 を欠損させた *ripAA ripP1* 二重変異株は、ベンサミアナタバコに対して萎凋症状を引き起こさなかった。これらの結果から、青枯病菌 RS1000 株の主要な Avr エフェクターは RipB であり、RipAA と RipP1 ではないことが明らかになった。

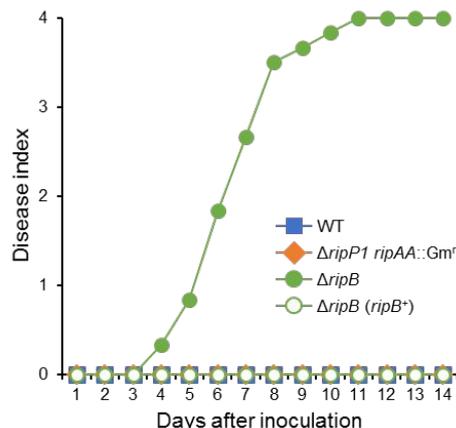


図 2. 変異株接種植物における萎凋症状

(3) RipB の認識に関わる抵抗性遺伝子

RipB のホモログであるトマト斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) の HopQ1 は抵抗性タンパク質 Roq1 に認識される。RipB の認識に Roq1 が関与するかを明らかにするため、ウイルス誘導ジーンサイレンシング法により *Roq1* を抑制したベンサミアナタバコを作出した。この *Roq1* 抑制植物と対照植物に *ripAA ripP1* 二重変異株を接種し、萎凋症状の進展を経日的に観察した。対照植物では接種 16 日後まで萎凋症状が認められず、健全に生育した (図 3)。一方、*Roq1* 抑制植物では接種 7 日後から萎凋症状が認められ、接種 14 日後には全ての個体が枯死した。この結果から、Roq1 は RipB の認識に関わることが明らかになった。

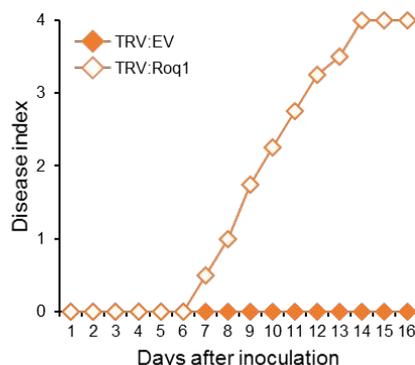


図 3. *Roq1* 抑制植物における萎凋症状

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Nakano M., Mukaiharu T., The type III effector RipB from *Ralstonia solanacearum* RS1000 acts as a major avirulence factor in *Nicotiana benthamiana* and other *Nicotiana* species, *Mol Plant Pathol.*, In press 査読有

DOI: 10.1111/mpp.12824

Nakano M., Mukaiharu T., *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAL targets chloroplasts and induces jasmonic acid production to suppress salicylic acid-mediated defense responses in plants, *Plant Cell Physiol.*, 59(12), 2576-2589, (2018) 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pcy177

Kiba A., Nakano M., Ohnishi K., Hikichi Y., The SEC14 phospholipid transfer protein regulates pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Physiol Biochem.*, 125, 212-218, (2018) 査読有

DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.02.002

Nakano M., Oda K., Mukaiharu T., *Ralstonia solanacearum* novel E3 ubiquitin ligase (NEL) effectors RipAW and RipAR suppress pattern-triggered immunity in plants, *Microbiology.*, 163(7), 992-1002, (2017) 査読有

DOI: 10.1099/mic.0.000495

Mukaiharu T., Hatanaka T., Nakano M., Oda K., *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAY is a glutathione-degrading enzyme that is activated by plant cytosolic thioredoxins and suppresses plant immunity, *mBio.*, 7(2), e00359-16, (2016) 査読有

DOI: 10.1128/mBio.00359-16

[学会発表] (計 5 件)

中野真人・向原隆文、青枯病菌における新規な非病原力エフェクターの同定、平成 31 年度日本植物病理学会大会、2019 年

中野真人・向原隆文、植物ホルモン情報伝達経路を標的とする青枯病菌エフェクターの探索と機能解析、平成 30 年度日本植物病理学会関西支部会、2018 年

中野真人・小田賢司・向原隆文、植物の自然免疫を抑制する青枯病菌エフェクターの同定と機能解析、平成 29 年度日本植物病理学会大会、2017 年

中野真人・小田賢司・向原隆文、植物の基礎的抵抗性を抑制する青枯病菌エフェクターの網羅的解析、中国四国植物学会第 73 回大会、2016 年

中野真人・小田賢司・向原隆文、E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ青枯病菌エフェクターは植物の自然免疫を抑制する、日本植物学会第 80 回大会、2016 年

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

該当無

(2) 研究協力者

該当無

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。