

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06061

研究課題名(和文)病原菌エフェクターによる植物の核機能のハイジャック機構の解明

研究課題名(英文)The Xanthomonas effector modulate defense responses in nucleus of rice

研究代表者

山口 公志 (Yamaguchi, Koji)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：20722721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：世界の農作物の約15%は病害により失われており、人口増加に伴う食料不足を考慮すると、この損失をどのように抑えるかが重要な課題である。病原菌のエフェクタータンパク質は、植物細胞内に分泌され、植物免疫の阻害など自身の増殖に有利な環境を作り出す。そのため、免疫抑制活性を持つエフェクターは、植物免疫の主要な機構を標的にしていると予想される。申請者は、イネ白葉枯病菌のエフェクターの中から、免疫抑制活性を有するエフェクターXopZを同定した。さらに、XopZの標的タンパク質がイネの免疫を正に制御することを明らかにし、耐病性イネを作出する上で、この標的タンパク質が有用な遺伝子資源となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、イネの耐病性機構を抑制するために、イネ白葉枯病菌病原菌が獲得してきたエフェクタータンパク質に着目した。これまでに、イネ白葉枯病菌エフェクターXopZの過剰発現イネの解析から、XopZがイネの免疫を阻害することを明らかにした。さらに、XopZのイネの標的因子として、機能未知のタンパク質を同定した。この機能未知タンパク質を欠損したイネは、イネ白葉枯病菌に罹病性を示すことから、この機能未知タンパク質がイネの免疫に関与する新規の遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The plant diseases represent a major threat to plant health. Successful pathogens are able to secrete or directly deliver effector proteins into the host cytoplasm that modulate host processes for their advantage. XopZ is one of the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) effector. XopZ suppresses PAMPs induced immunity in rice. To identify the host target of XopZ, I screened proteins that interact with XopZ using a yeast two-hybrid system. I identified the hypothetical protein of unknown functions. To clarify the roles of the hypothetical protein in rice immunity, we generated the hypothetical protein knock-out mutant. The knock-out mutant compromise for the resistance to Xoo.

研究分野：植物免疫学

キーワード：エフェクター 植物免疫 イネ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は病原菌から身を守るため、自身の細胞膜上の病原菌認識受容体を介して、病原菌を構成する様々な因子を病原菌に特有な分子パターン(Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs))として認識する。この病原菌の認識に伴い、植物細胞内では様々なシグナル伝達経路が迅速に活性化され、抵抗性反応が発動される。一方で、病原菌は宿主の抵抗性反応を抑制するため、分泌装置を介して宿主細胞内へ直接的に多様なタンパク質(エフェクター)を送りこみ、エフェクターが宿主の免疫因子の機能を阻害することにより、感染を拡大する。しかし、エフェクターは進化的に新しく獲得されたタンパク質であり、エフェクターがどのようにして宿主の抵抗性反応を抑制しているかは十分に理解されていない。本研究では、強い免疫抑制活性を示し、宿主の核に局在するユニークな特徴を持つ XopZ によるイネ免疫の抑制機構の解明を目指した。エフェクターの標的因子の解析から、多くの免疫因子が同定されている一方で、核局在型のエフェクターの宿主標的因子の報告はほとんどない。そのため、本研究の成果は、エフェクター研究の発展に繋がるだけでなく、核内因子による新たな免疫発動機構の発見にも貢献できると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) XopZ は *Xanthomas* 属に広く保存されているエフェクターである。XopZ は既知のタンパク質と相同性を示さず、アミノ酸配列からは機能を推定することはできない。XopZ はイネの核に局在することから、転写因子やクロマチン修飾を介したエピジェネティックな転写制御に関連する因子を標的としている可能性が高いと予測されるが、XopZ がどのようにして、植物免疫を阻害しているのかは不明である。本研究では、XopZ 過剰発現体を利用して、イネの免疫シグナルに対する XopZ の作用点を探索する。(2) XopZ は、イネ白葉枯病菌が進化の過程で獲得した核局在性エフェクターである。そのため、XopZ を利用することで、既知のスクリーニングでは単離が難しい核内の免疫制御因子を同定できる可能性が高いと考えた。そこで、XopZ のイネ標的因子の探索を通じて、イネの新規の免疫シグナル伝達機構の同定を試みる。

### 3. 研究の方法

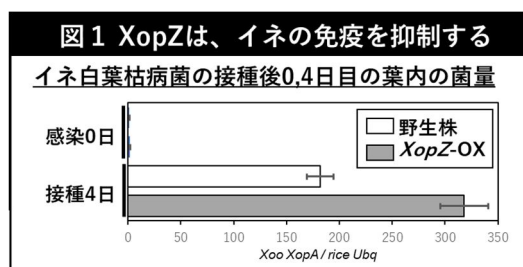
(1) 代表者は、XopZ 過剰発現イネを利用して、XopZ によるイネの免疫抑制機構の作用点を明らかにできると考えた。近年、XopZ の転写開始点が既知の情報よりも 300bp 上流であることが報告された。そこで、新たに XopZ 過剰発現イネを作出し、これらを利用して、XopZ によるイネの免疫阻害機構の実体解明を目指す。代表者は XopZ に核外移行シグナル(NES)付与することで、XopZ の細胞内局在を細胞質に移行させることに成功している。そこで XopZ-NES 過剰発現イネを作出し、免疫応答の解析を行うことで、宿主細胞での XopZ の核の局在性が宿主因子の免疫抑制の活性に重要であることを証明する。

(2) 代表者は、酵母 Two Hybrid 法を利用し XopZ の相互作用因子を探索し、3種類の標的候補タンパク質を同定し、それぞれを XopZ Interacting Proteins (ZIPs)と命名した。ZIP1 と ZIP2 は転写因子をコードし、ZIP3 は機能未知タンパク質であった。そこで、XopZ のイネの標的因子を絞り込むために、酵母ツーハイブリッド法や免疫沈降法など、様々なタンパク質間相互作用を解析できる技術を利用して、XopZ の標的因子を絞り込む。さらに、ゲノム編集技術を利用して、ZIPs 機能欠損イネを作出し、ZIPs がイネの免疫に関与する因子であることを検証する。

(3) XopZ は自身の N 末に Coiled Coil (CC)ドメイン構造を有している。同様に、ZIP1 と ZIP3 も CC ドメインの構造を有している。これまでに、XopZ は ZIP1 や ZIP3 と CC ドメインを介して強く相互作用していることを明らかにした。さらに、ZIP3 や ZIP1 は CC ドメインを介して、2量体を形成することも明らかにした。本研究では、XopZ が ZIP1 や ZIP3 の CC ドメインを介した 2量体形成に与える影響を解析することで、XopZ による宿主標的因子の活性化の阻害機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) イネ白葉枯病菌のゲノムを利用して、既報の XopZ より 300bp 長い配列をクローニングし、研究に利用した。アグロバクテリウムを利用して、XopZ 過剰発現イネを作出し、XopZ の発現量の異なる複数のラインを得ることに成功した。XopZ 過剰発現イネと野生株(日本晴)のイネにイネ白葉枯病菌を接種し、葉内のイネ白葉枯病菌の量を比較した。図1に示すように、XopZ 過剰発現イネの葉内の菌数は、野生株よりも多かった。以上の結果から、XopZ がイネの免疫を抑制する機能を持っていることが示唆された。さらに、イネプロトプラストに、XopZ に核外移行シグナルと蛍光タンパク質を付加したプラスミドを形質転換し、局在を観察した結果、XopZ の細胞内局在を細胞質に変えることができた。現在、核外移行シグナルを付加した XopZ 過剰発

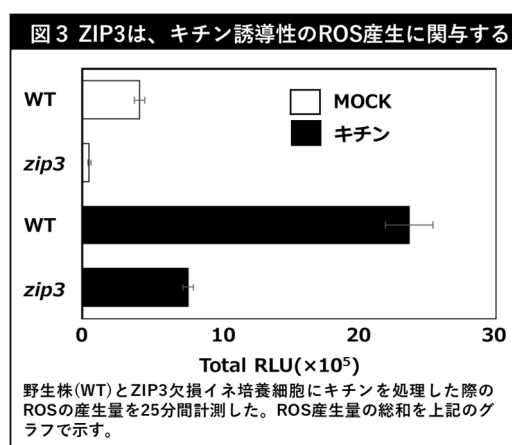
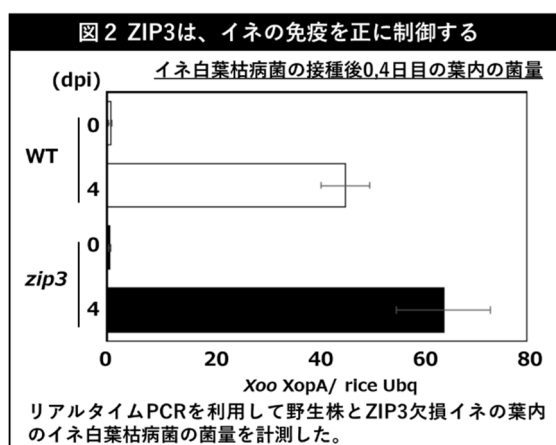


リアルタイムPCRを利用して野生株と XopZ-OX の葉内のイネ白葉枯病菌の菌量を計測した。

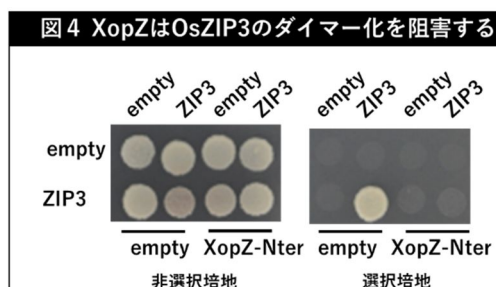
現イネを作出しており、ホモラインが得られ次第、耐病性試験を実施していく。

(2) XopZ の標的候補因子として、ZIPs が単離された。酵母ツーハイブリッドを利用した解析から、XopZ の CC ドメインと機能未知タンパク質 ZIP3 の CC ドメインが強く相互作用することを明らかにした。タバコにおけるタンパク質の一過的発現系を利用して、XopZ の CC ドメインと ZIP3 の CC ドメインをタバコ葉に共発現させた。その後、共免疫沈降法を利用して、XopZ の CC ドメインと ZIP3 の CC ドメインの相互作用を解析した結果、XopZ の CC ドメインと ZIP3 の CC ドメインが相互作用していることを明らかにした。さらに、ZIP3 は CC ドメインを有していたため、生体内で 2 量体を形成するかを解析した。タバコ葉で異なるタグを付加した ZIP3 の CC ドメインを発現させ、共免疫沈降法を利用して、ZIP3 の CC ドメイン同士の相互作用を解析した。その結果、生体内で、ZIP3 は 2 量体を形成することを明らかにすることができた。

(3) XopZ の標的タンパク質である ZIP3 は機能未知タンパク質であるため、ゲノム編集技術を利用して ZIP3 機能欠損イネを作出した。ZIP3 欠損イネと野生株 (日本晴) にイネ白葉枯病菌を接種し、葉内のイネ白葉枯病菌の菌量を比較した。その結果、ZIP3 欠損イネでは、野生株よりも顕著にイネ白葉枯病菌の菌が増殖していた (図 2)。以上の結果を踏まえると、ZIP3 はイネの免疫を正に制御するタンパク質であることが示唆された。さらに、ZIP3 欠損イネ培養細胞を作出し、PAMPs であるキチンを処理した際の ROS の産生量を解析した。その結果、ZIP3 欠損イネ培養細胞におけるキチン処理に応答した ROS の産生量は野生株よりも低かった (図 3)。以上の結果から、ZIP3 はイネの PAMPs 誘導性の免疫に関与していることが示唆された。



(4) XopZ と ZIP3 のタンパク質の機能は未だ明らかとなっていない。そのため、XopZ がどのように ZIP3 の機能を阻害しているかについての知見はない。本研究において、XopZ の CC ドメインが ZIP3 と相互作用するのに重要であることが明らかとなった。そして、ZIP3 が 2 量体を形成することから、XopZ が ZIP3 の 2 量体形成を阻害することで、ZIP3 の機能を抑制しているのではないかと考えた。そこで、酵母ツーハイブリッド法を利用して、XopZ が ZIP3 の 2 量体形成に与える影響を解析した。その結果、XopZ を発現させると ZIP3 の 2 量体形成が阻害された (図 4)。さらに、タバコを利用した一過的発現系を用いた共免疫沈降法による解析でも、XopZ は ZIP3 の 2 量体形成を阻害した。以上の結果から、XopZ は ZIP3 の 2 量体形成を阻害することで、ZIP3 を介したイネの免疫誘導を阻害していることが示唆された。



OsZIP3を形質転換した酵母が選抜培地上で生育するため、OsZIP3はホモダイマー化する。一方で、CCドメインを含むXopZのN末部分を発現させると、OsZIP3を形質転換した酵母は生育しないため、OsZIP3ダイマー化阻害が生じている。

以上の結果から、XopZ は ZIP3 の 2 量体形成を阻害した。以上の結果から、XopZ は ZIP3 の 2 量体形成を阻害することで、ZIP3 を介したイネの免疫誘導を阻害していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ichimaru Kota, Yamaguchi Koji, Harada Kenichi, Nishio Yusaku, Hori Momoka, Ishikawa Kazuya, Inoue Haruhiko, Shigeta Shusuke, Inoue Kento, Shimada Keita, Yoshimura Satomi, Takeda Takumi, Yamashita Eiki, Fujiwara Toshimichi, Nakagawa Atsushi, Kojima Chojiro, Kawasaki Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Cooperative regulation of PBI1 and MAPKs controls WRKY45 transcription factor in rice immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2397-2397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30131-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本剛大 木村泉貴 吉村智美 山口公志 津下誠治 川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌エフェクター XopZ による新規免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会・名古屋大学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口公志 山本剛大 木村泉貴 吉村智美 川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌エフェクターXopZによる核内標的因子を介した免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会・つくば国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口公志 山本剛大 木村泉貴 吉村智美 川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌エフェクターXopZによる核内標的因子を介した免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会・つくば国際会議場
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Yamaguchi, Gohta Yamamoto, Satomi Yoshimura, Seiji Tsuge, Tsutomu Kawasaki
2. 発表標題 A Xanthomonas effector suppresses host immunity possibly by inhibiting dimerization of host factor.
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII Congress・グラスゴー（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾谷卓海、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 アブラナ科黒腐病菌エフェクターXopZによる宿主標的因子を介した免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田朋輝 山本剛大 山口公志 吉村智美 川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌エフェクターXopZによるOsZIP3を介したイネ免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------