

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580050

研究課題名(和文) 植物の小胞輸送を介した防御応答反応を抑制する青枯病菌エフェクターの解析

研究課題名(英文) Analyses of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins that can suppress plant disease resistance responses mediated by vesicular trafficking

研究代表者

向原 隆文 (MUKAIHARA TAKAFUMI)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・専門研究員

研究者番号：80344406

研究成果の概要(和文)：ナス科作物に甚大な被害を及ぼす青枯病の原因細菌 *Ralstonia solanacearum* は、III型分泌系を用いて宿主植物の細胞内に病原性因子(エフェクター)を注入して感染を成立させる。本研究では、青枯病菌が約70種類ものエフェクターを有していることを世界で初めて明らかにした。エフェクターを発現する形質転換植物並びに酵母を用いてエフェクター機能を詳細に調べた結果、真核細胞の小胞輸送系を阻害すると考えられるエフェクターを複数見出した。

研究成果の概要(英文)：*Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt on solanaceous plants, injects virulence effector proteins into host plant cells via a type III secretion system to cause disease. In this study, we found that *R. solanacearum* possesses over 70 type III effectors. We constructed a series of recombinant plants and yeasts that express individual effector protein and identified effector proteins that show an ability to suppress vesicular trafficking in eukaryote cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病原性因子

1. 研究開始当初の背景

動物および植物に病気を引き起こすグラム陰性病原細菌の多くで、III型分泌系は感染に必須な役割を果たしている。III型分泌装置から宿主細胞内に注入されるエフェクターは、特定の細胞機能を不活性化することで植物が本来発揮すべき病害応答反応を攪乱すると考えられている。病原細菌は感染時に複数のエフェクターをセットで宿主細胞に注入して防御応答を抑制し、最終的に自身が増殖できる環境を作り出していると推察さ

れていた。

申請者が材料とする *R. solanacearum* は、ナス科作物の生産に最も大きな被害を及ぼす細菌病の一つ、青枯病の原因細菌である。本菌は植物の根や傷口から進入すると、道管内で増殖しながら全身に広がり、粘液性の多糖類を大量に分泌して植物の水分通道を阻害し、植物を枯死させる。*R. solanacearum* のIII型分泌装置(Hrp)欠損変異株は植物内での増殖能力を完全に失い、病原性が無くなる。このことから、本菌も宿主細胞にエフェク

一を注入して植物内増殖を可能にする戦略をとっていることは明白であった。これらの知見から、*R. solanacearum* の植物内増殖機構を理解するためには本菌の全エフェクターの同定と各エフェクターの植物細胞内機能の解明が必須の課題となっていた。

当時の研究状況は、フランスとアメリカの研究グループが宿主域の異なる2つの青枯病菌（GMI1000株とUW551株）のゲノム配列を決定したところであり、ゲノム情報を利用したエフェクターの網羅が世界的に競われていた。一方、申請者は*R. solanacearum* のエフェクター遺伝子の発現制御機構に着目し、独自のスクリーニング系から約30の推定エフェクター遺伝子（*hpx*）を単離して解析していた。これら推定エフェクターの分泌解析と植物細胞内移行解析、さらにゲノム情報からのスクリーニングで44種を特定していたが、さらに多くのエフェクターの存在が予想されていた。

2. 研究の目的

R. solanacearum のIII型分泌系を介した植物内増殖機構を明らかにするために、以下の3つを研究の目的とした。

(1) 日本産*R. solanacearum* RS1000株におけるエフェクターの網羅的同定

ゲノム配列が報告されたGMI1000株は日本産の*R. solanacearum* RS1000株と同じレースに属するが、原産地は南米であり、ゲノム配列もよく似てはいるものの異なる部分も多数存在する。また、当時はエフェクターに関する情報が少なく、ゲノム配列情報からの*in syrico* 検索ではエフェクターをすべて拾い上げることは不可能と考えられた。このため、エフェクター遺伝子のみを選択的に単離できる機能的スクリーニング法を開発し、日本産*R. solanacearum* でエフェクター網羅を目指した。エフェクターの中には同一の機能を持つものが複数存在することも予想され、後の機能解析のためにも完全網羅は第一に解決すべき課題と考えた。

(2) エフェクターを発現する形質転換植物並びに酵母シリーズの作出

エフェクターがどのように植物細胞に作用するかを調べるために、エフェクターを発現する形質転換植物を作出することとした。解析を迅速に行うために真核細胞モデルとして酵母の利用も考えた。

(3) 真核細胞の小胞輸送系を阻害するエフ

エクターの同定と機能解析

植物の防御応答反応において小胞輸送は、カロースや抗菌性物質の細胞外分泌、液胞への塩基性PRタンパク質の蓄積など、抵抗反応の最下流で必要とされるばかりでなく、PAMPs（pathogen-associated molecular patterns）レセプターのエンドサイトーシスなど、シグナル伝達の最上流においても重要な役割を担う。形質転換植物並びに酵母シリーズを用いて小胞輸送阻害エフェクターを同定し、詳細な機能解析を行うことで、エフェクターによる抵抗反応抑制機構の一端の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 機能的スクリーニングによるエフェクター遺伝子の網羅的同定

R. solanacearum エフェクターの最も重要な性質は「III型分泌系を介して植物細胞内に注入される」ことである。III型分泌シグナルはエフェクターのN末端側の約100アミノ酸内に存在することが知られている。そこで、III型分泌シグナルを特異的に検出するスクリーニング系を構築し、エフェクター遺伝子の大規模スクリーニングを行った。

(2) エフェクターを発現する形質転換植物並びに酵母シリーズの作出

同定したエフェクター遺伝子をカセット化し、植物並びに酵母ベクターに組み込んで形質転換体をそれぞれ作出した。目的に応じて使い分けるために、構成的プロモーターと誘導性プロモーターの2種類を用いた。

(3) 真核細胞の小胞輸送系を阻害するエフェクターの同定と機能解析

最初に、酵母において、液胞への選択的小胞輸送を阻害する活性を有するエフェクターを探索した。次に、小胞輸送阻害エフェクターを発現する植物の表現型を調べた。また、*R. solanacearum* の病原性における役割を調べるために、同定された一群の小胞輸送阻害エフェクター遺伝子をすべて欠く遺伝子重複破壊株を作出し、野生株と病原性を比較した。

4. 研究成果

(1) 日本産*R. solanacearum* RS1000株におけるエフェクターの網羅的同定

トランスポゾン mini-Tn5 に開始コドンに欠いた *cya* レポーター遺伝子を組み込み、III型分泌シグナル検出トランスポゾン構築した。このトランスポゾンがエフェクター遺伝子内に転移し、III型分泌シグナルの下流に

Cya レポーターが in frame で融合したときのみ、Cya は植物細胞内に移行する。この時、作出した Tn 挿入株の接種葉では cAMP レベルの著しい上昇が観察される (Cya レポーターの活性による)。約 10 万の Tn 挿入株をスクリーニングし、300 の移行陽性株を単離した。Tn が挿入された遺伝子領域の解析からエフェクターをコードすると考えられる遺伝子を特定し、産物が III 型分泌系に依存して植物細胞内に注入されることを確認した。

最終的に、これまでの解析から見出していた 44 種のエフェクターに加え、28 種類のエフェクターを今回、新規に見出すことに成功した。Tn の挿入状況から見て、ほぼ全てのエフェクターを網羅できたと判断される。この結果を取りまとめ、*R. solanacearum* は総数で 72 種類のエフェクターを有することを世界で初めて報告した。この数は III 型エフェクターを有する動植物病原細菌の中で最多である。本菌は、広範な宿主域とそれが変化しやすいことが大きな特徴として挙げられ、これが効果的な抵抗性育種を阻む大きな要因となっているが、エフェクター数の多さがその原因の一つとなっている可能性がある。

(2) エフェクターを発現する形質転換植物並びに酵母シリーズの作出

同定した *R. solanacearum* の III 型エフェクター (総数 72 種) 全てについて遺伝子カセットを作出した。開始コドンの前に *XbaI* (5'-TCTAGA-3')、終止コドンの後に *SpeI* (5'-ACTAGT-3') を付加したプライマーセットで各エフェクター遺伝子を増幅し、*XbaI*-ORF-*SpeI* の遺伝子カセットを作成した。*XbaI* と *SpeI* でエフェクター遺伝子 (ORF) を切り出すことができる。この遺伝子カセットを利用して植物並びに酵母でのエフェクター発現プラスミドを構築した。それぞれ、構成的に発現するプロモーター (植物では CaMV 35S プロモーター、酵母では TPI プロモーター) と誘導的に発現するプロモーター (植物では DEX 誘導性プロモーター、酵母では *GALI* プロモーター) を用いて一連のプラスミドシリーズを構築した。

酵母形質転換体の作出の過程で、酵母に形質転換できないエフェクター発現プラスミドを見出した。誘導発現プラスミドで確認したところ、酵母細胞の生育に阻害効果を示す 9 つのエフェクターを見出した。そのうち 1 つは強力な生育阻害活性を持っていた。

形質転換植物ラインは約半数の整備を終了し、残り半数の整備を進めている段階であ

るが、植物の生育に阻害効果を示すエフェクターが既に 10 種類以上見出されており、興味深い。酵母に対して致死効果を示すエフェクターは植物に対しても同様の活性を示すことが明らかになった。植物病原細菌における III 型エフェクタートキシンと考えられる。

(3) 真核細胞の小胞輸送系を阻害するエフェクターの同定と機能解析

R. solanacearum の全エフェクター遺伝子を構成的プロモーターを用いて酵母細胞内で発現させた。酵母構成的発現系を用いた解析から、酵母細胞の液胞への選択的小胞輸送を強力に阻害する活性を持つエフェクターを 8 種類同定した。これらの中には、*R. solanacearum* で大きな遺伝子ファミリーを構成しているエフェクターが含まれており、ファミリーメンバーすべてが同じ活性を有していることが明らかになった。類似エフェクターは *Xanthomonas* 属細菌にも分布しており、大変興味深い。

植物細胞内でこれらのエフェクターを一過的に発現させたところ、植物に壊死様反応が見られた。誘導発現系を利用して形質転換植物を作出したところ、小胞輸送阻害エフェクターのほとんどで、形質転換植物の生育阻害が観察された。小胞輸送は植物の生理機能と密接に関連しており、また、酵母と植物の小胞輸送に関わるタンパク質群はよく保存されている。以上の理由から、これらのエフェクターは植物細胞内においても小胞輸送を阻害している可能性が考えられる。一過的発現系を利用して、植物の小胞輸送を介した抵抗反応へのこれらエフェクターの作用効果を検討した結果、PAMP によるカロース蓄積を阻害する活性を有するエフェクターを見出すことに成功した。

小胞輸送阻害活性を有するエフェクターの遺伝子を個々に欠損した遺伝子破壊株を作出し、病原性を野生株と比較したが著しい病原性の低下は観察されなかった。ファミリーを形成するエフェクター群のメンバーすべてを欠損させた重複遺伝子破壊株を作出したが、宿主植物に対する病原性は大きく変化しなかった。機能的に重複したエフェクターが複数存在することから、現在、小胞輸送阻害エフェクターをすべて欠損させた菌株の作出を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

- ① Takabatake, R. and Mukaihara, T. (2011) Extracts from *Ralstonia solanacearum* induce effective resistance to the pathogen in both *Arabidopsis* and solanaceous plants. **Journal of General Plant Pathology** 77: 33-42. 査読有
- ② Mukaihara, T., Tamura, N., and Iwabuchi, M. (2010) Genome-wide identification of a large repertoire of *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins by a new functional screen. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23: 251-262. 査読有
- ③ Mukaihara, T. and Tamura, N. (2009) Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins through translocation analysis of *hrpB*-regulated gene products. **Microbiology** 155: 2235-2244. 査読有
- ④ 田村尚之、向原隆文 (2008) 細胞融合によるナス台木の青枯病抵抗性育種 植物防疫 vol.62, 64-67. 査読無

〔学会発表〕(計6件)

- ① 向原隆文、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の III 型分泌系を介した植物感染機構、第 82 回日本細菌学会総会シンポジウム、2009 年 3 月、名古屋
- ② 向原隆文、ゲノムワイドな機能的スクリーニングから見えてきた青枯病菌 III 型エフェクター群の全貌、平成 21 年度日本植物病理学会大会課題別シンポジウム、2009 年 3 月、山形
- ③ 高畠令王奈、真核細胞の小胞輸送を阻害する青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* タイプ III エフェクターの同定、第 49 回日本植物生理学会、札幌
- ④ 高畠令王奈、青枯病菌の菌体成分による植物の基礎的抵抗性反応の誘導、平成 20 年度日本植物病理学会大会、2008 年 4 月、松江
- ⑤ 向原隆文、新規手法による青枯病菌 III 型エフェクター遺伝子の機能的スクリーニング、平成 20 年度日本植物病理学会大会、2008 年 4 月、松江
- ⑥ 高畠令王奈、青枯病菌の菌体成分による植物免疫反応の誘導およびエフェクターによる抑制、2008 年日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月、神戸

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向原 隆文 (MUKAIHARA TAKAFUMI)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究
所・専門研究員

研究者番号：80344406