

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580059

研究課題名（和文）イネ白葉枯病菌感染初期における菌体外分泌因子の作用機構の解析

研究課題名（英文）Expression analysis of rice genes affected by type II and III dependent protein secretion in the early infection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

## 研究代表者

落合 弘和（OCHIAI HIROKAZU）

独立行政法人農業生物資源研究所・植物・微生物間相互作用研究ユニット・主任研究員

研究者番号：30370646

研究成果の概要（和文）：タイプ II 装置を介して分泌される因子は、イネ白葉枯病菌の感染において増殖性と病原性の確保に必須であるが、宿主の防御応答関連遺伝子の発現を誘導させてしまう。どのようにしてそれを回避し、病原性を発揮するかについて宿主の遺伝子発現レベルで解析した。その結果、イネ白葉枯病菌はもう一つのタイプ III 装置を介して分泌するエフェクター分子によって、宿主の防御応答に関わる遺伝子群の発現を遅延・抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：T2S substrates are not only associated with virulence but also induce plant defense responses in the infection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Expression analysis of rice genes revealed that induction of basal plant defense related genes such as PR and transcription factors, were suppressed by type III effectors.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

イネ白葉枯病菌はイネの重要な病原細菌である。本菌の重要な病原因子の一つに、細胞壁成分分解酵素を含む各種加水分解酵素群があり、それらは、宿主内における増殖と病原性に必須であると報告されている。これらの酵素群はタイプ II と呼ばれる分泌装置を介して分泌されるが、本装置を構築できない変異株は宿主イネへの病原性を欠失する。

一方、本菌ではタイプ II 分泌装置とは別の

タイプ III 分泌装置も宿主内における増殖と病原性に必須なものである。イネ白葉枯病菌をはじめとする植物病原細菌は本分泌装置を介して分泌されるタイプ III エフェクターと呼ばれるタンパク質（シグナル分子）を宿主細胞内に直接注入し、その結果、宿主植物はシグナル伝達機構の攪乱（罹病化反応）や細胞死の誘導（抵抗性反応）等の様々な生理反応を引き起こされることが明らかにされている。

近年の研究は主に、タイプ III エフェクタ

一の機能解明を中心に展開してきているが、タイプ II 分泌酵素（分解産物）が宿主の防御応答の誘導因子（エリシター）となり、宿主の基礎的抵抗性を誘起させることから、病原性機構を解明するには、両者の機能を理解することが必要である。

イネ白葉枯病菌の感染過程において、タイプ II 因子は宿主内における増殖性確保と病原性発現に関わる反面、宿主の防御応答を誘導し、一方、タイプ III エフェクターはその防御応答を抑制することによって感染を成立させるという相互関係にある。しかしながら、これらは植物の基礎的抵抗反応の一つであるカロースの蓄積と細胞死を指標とした結果であり、具体的な宿主側の遺伝子発現応答に関しては、ほとんど知見がないのが現状であった。従って、感染初期において病原細菌が分泌する各種エフェクター等の宿主に対する生理機能の詳細は未だ明らかでないという現状であった。

予備的試験として、白葉枯病菌を接種したイネの遺伝子発現解析から、タイプ III 分泌装置の欠損変異株の接種後 24 時間において、耐病性関連遺伝子の発現増加が見られるという結果を得て、すなわち、タイプ III エフェクターによる防御応答反応の抑制はこのタイミングで起こることを推察していた。

そこで、タイプ II 因子による基礎的抵抗性の誘導とそれを抑制するタイプ III エフェクターの機能を宿主の遺伝子発現応答を通して理解するために研究を行うことにした。

## 2. 研究の目的

これまでイネ白葉枯病菌の病原性機構の分子基盤の確立を目指し、全ゲノム解読、タイプ III エフェクターの探索を行い、少なくとも 16 のエフェクターを同定した。本研究は、病原性機構の基盤情報を得るために、タイプ II 分泌因子等によって発現が誘導される宿主防御遺伝子に対して、白葉枯病菌がどのようにしてそれを回避し宿主に病原性を発揮するかを解析し、それにより、タイプ III エフェクターの感染過程における生理機能について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析によるタイプ III エフェクターによって抑制される宿主防御応答遺伝子の探索

タイプ III 分泌装置欠損変異株 ( $\Delta$ hrcV) 及び野生株を剪葉接種法でイネ（日本晴）に接種し、6, 12, 24, 48, 96 時間後に RNA を回収後、マイクロアレイに供試した。Mock 処理（滅菌水接種）におけるデータでそれぞれの結果を標準化した後、野生株と各変異株間における宿主防御関連遺伝子中心した遺伝子発現差違を指標として、タイプ III エフェ

クターによって発現が抑制されている遺伝子を選抜した。

(2) 抵抗反応が誘導した条件下においてタイプ III エフェクターによって発現が影響される宿主防御応答遺伝子の RT-PCR による解析

既存の誘導抵抗剤（サリチル酸；SA、ジャスモン酸；JA、オリゼメート、ブイゲット）を事前に処理し、イネ（日本晴）に抵抗反応を誘導させた条件下において、タイプ III 分泌装置欠損変異株 ( $\Delta$ hrcV) 及び野生株を剪葉接種法でイネ（日本晴）に接種し、1 日目、2 日目に RNA を回収後、RT-PCR を行った。アクチン遺伝子の発現をコントロールとして、各種防御応答遺伝子の発現比較を行った。

## 4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析によるタイプ III エフェクターによって抑制される宿主防御応答遺伝子の探索

① 遺伝子発現プロファイルの階層クラスタリングによる解析

mock、野生株、タイプ III 分泌装置欠損変異株 ( $\Delta$ hrcV) 接種区のマイクロアレイによって得られたデータ（5 回分）を平均化し、それぞれ 1 つのデータとし、500 以下の Raw Signal を削除した後、接種 3 時間後の mock より得られたデータで標準化を行った。Processed Signal (P. S.) が  $-1 < P. S. < 1$  のものを取り除き、残された 14208 プローブに対して階層クラスタリング解析を行った。接種 3 時間後の mock のデータをコントロールし、階層クラスタリング解析した結果、発現パターンは接種後 12 時間から 24 時間にかけて大きく変動することが明らかになり、この時間において、白葉枯病菌がイネに対し何らかの影響を及ぼすことが示唆された（図 1）。また、接種 48 時間後以降では、野生株と変異株間において発現パターンが変化することから、白葉枯病菌の感染成立、発病過程への進行はこの期間に決定されることが示唆された。

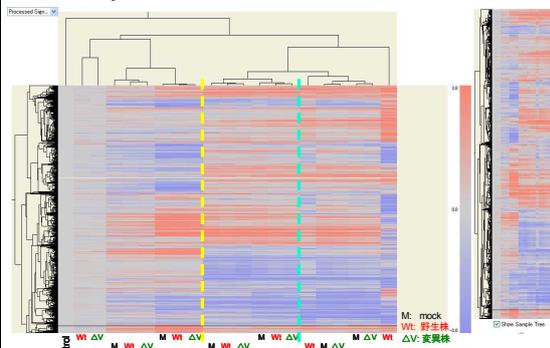


図 1 遺伝子発現プロファイルの階層クラスタリング解析

②白葉枯病菌エフェクターによって影響されるイネ遺伝子数の経時的変動

野生株接種と比較し、エフェクター分泌能欠損変異株 ( $\Delta hrcV$ ) 接種によって発現比が 1.5 倍以上のものを選抜した。その結果、 $\Delta hrcV$  接種によって発現が変動する遺伝子数は、接種後 6 時間で 72 遺伝子 (増加 38、減少 39)、24 時間では 119 遺伝子 (増加 41、減少 78)、48 時間では 141 遺伝子 (増加 64、減少 77)、96 時間では 1332 遺伝子 (増加 700、減少 632) であった (図 2)。発現が増加あるいは低下した遺伝子数は、徐々に増加し、96 時間ではそれぞれ約 700 遺伝子となったが、その多くは機能不明のものであった。一方、野生株とエフェクターを分泌しない  $\Delta HrcV$  接種間における遺伝子発現変動パターンを

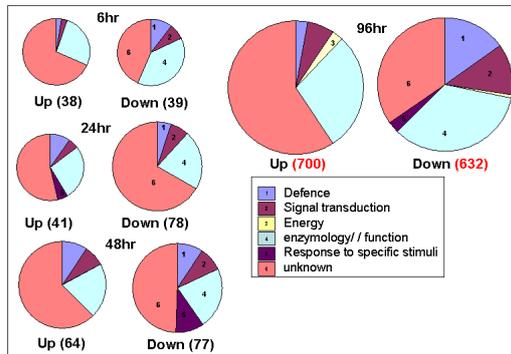


図 2  $\Delta hrcV$  株接種によって発現に差が認められる宿主遺伝子数の経時変化

比較した結果、接種 24 時間後において、顕著に野生株に対し  $\Delta HrcV$  接種によって発現上昇する遺伝子数の増加が認められた (図 3)。

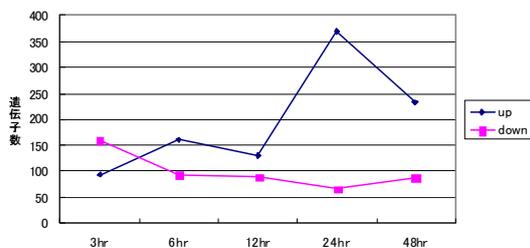


図 3 野生株と比較し、 $\Delta hrcV$  接種において相対的に発現量が変動する遺伝子数の経時変化

③WRKY 型転写因子の発現変動

WRKY 型転写因子に着目し、それらの変動 (fold change が 1.5 以上) を調べたところ、15 種類がエフェクターの有無によって影響を受け、それらの発現変動は接種後 12 時間で野生株接種と比較し、エフェクターを分泌できない変異株接種によって発現が一過的に上昇する傾向が認められた (図 4)。これらのことから、エフェクターの一つの作用は感染初期に宿主の転写因子の発現を制御する

ことによって、宿主の遺伝子発現を攪乱させ、感染成立に至るとということが推察された。

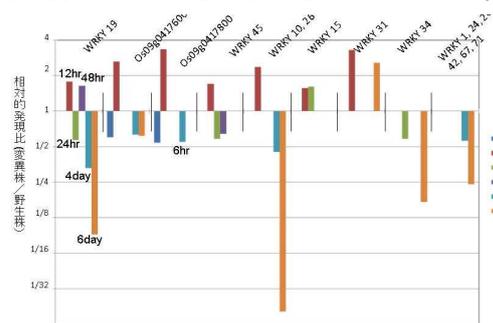


図 4 WRKY 型転写因子の経時的発現変動

④他の転写因子の発現変動

WRKY 型転写因子以外の他の転写因子について、エフェクターによる遺伝子発現の影響について検討した。その結果、NAC, Myb, HLH, bZIP, GRAS 型転写因子の変動 (fold change が 1.5 以上) は WRKY 型転写因子とは異なり、接種後 24 時間後にエフェクターを分泌しない  $\Delta HrcV$  接種によって、発現が抑制される傾向が見られた (図 5)。

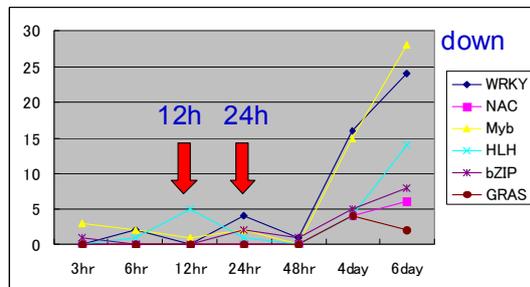
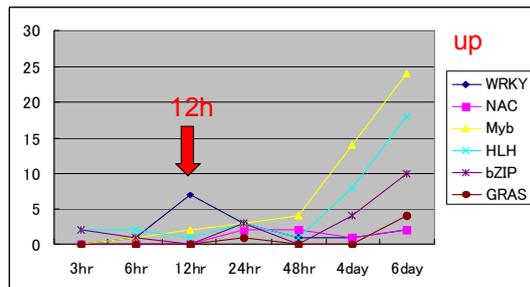


図 5 代表的な転写因子の経時的発現変動

(2) マイクロアレイ解析によるタイプ II によって誘導される宿主防御応答遺伝子の解析

エフェクターの作用は、経時的な宿主の転写因子の発現を制御し、宿主の遺伝子発現を攪乱させるとこれまでの結果から推察されたが、タイプ II における発現解析結果から、タイプ II によって誘起される宿主の防御応答とは、予想に反して接種 6 時間後のごく初期におけるキチナーゼ、ペータグルカナーゼといった一部の PR 産物に限定されており、すべての防御関連遺伝子の発現に関わっていないことが示唆された。また、タイプ II

による作用がないことにより、逆に他の PR 産物の発現を増加させる結果となったことから、タイプ II による作用は病原細菌の増殖性と病原性発揮以外に予測していなかった PR 産物の発現抑制にも関連することが示唆された。

(3) 抵抗反応誘導した条件下においてタイプ III エフェクターによって発現が影響される宿主防御応答遺伝子の RT-PCR による解析

#### ①RT-PCR による PR1 遺伝子の発現解析

タイプ II を介して分泌される酵素によって産生される宿主細胞壁分解産物（エリシター）による宿主の基礎的抵抗性反応について、その代表のひとつとして PR 遺伝子を指標とした解析を行った。その結果、エフェクターを分泌できないタイプ III 変域株では、接種後 24 時間で発現が増加する PR 遺伝子が増加する傾向が見られた。PR1a と PR1b 遺伝子について RT-PCR で検証した結果、変異株において発現量が増加することが明らかになった。エフェクターの作用の一つは、接種 24 時間後における基礎的抵抗反応である PR 遺伝子群の発現を抑制することが示唆された。

#### ②誘導抵抗剤によって抵抗反応が誘導された条件下における各種遺伝子の RT-PCR による発現解析

既存の各種誘導抵抗剤（サリチル酸；SA、ジャスモン酸；JA、オリゼメート、ブイゲット）を事前に処理し、イネ（日本晴）に抵抗反応を誘導させた条件下において、タイプ III 分泌装置欠損変異株（ $\Delta$ hrcV）及び野生株を剪葉接種法でイネ（日本晴）に接種し、1 日目、2 日目に RNA を回収後、RT-PCR を行った。タイプ III エフェクターによる発現抑制について、 $\Delta$ hrcV 接種による発現の増加として評価を行った。その結果、SA では接種後 2 日目において、PBZ1 遺伝子の発現が顕著に増加することが明らかになり、エフェクターによって発現抑制がされることが示唆された。また、ブイゲットにおいては接種後 1 日目から顕著に発現が抑制されることが明らかになった（図 6）。

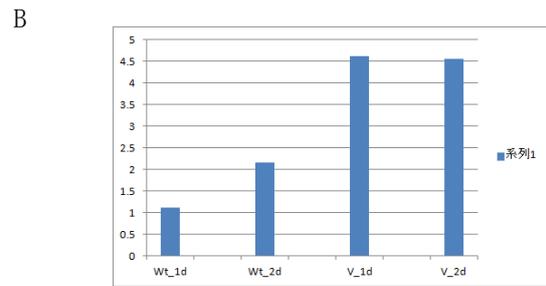
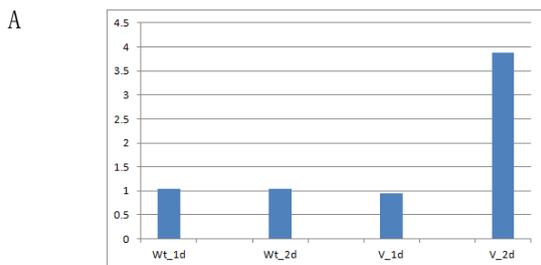


図 6 誘導抵抗剤 SA、ブイゲット処理による PBZ1 遺伝子の発現比較（A：SA、B：ブイゲット）

同様に、JA 処理では転写因子 WRKY45 が接種後 1 日目から発現が抑制されることが明らかになった。転写因子 NAC6 では、オリゼメート、ブイゲットによって、転写因子 NAC4 では、SA によって発現が抑制されることが明らかになった（図 7）。

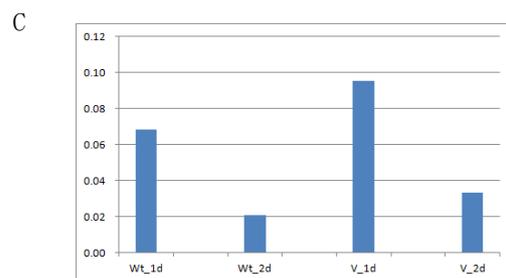
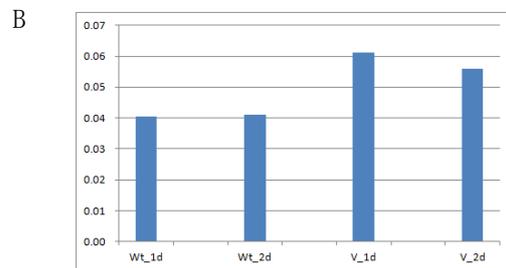
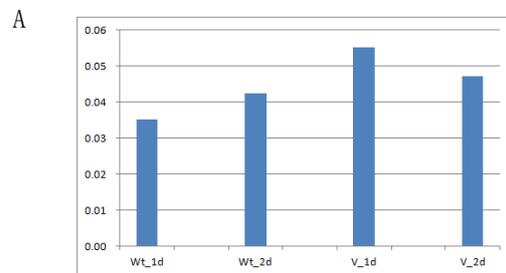


図 7 転写因子の誘導抵抗剤による発現比較（A：オリゼメート、NAC6、B：ブイゲット、NAC6、C：SA、NAC4）

それ以外に、SA 処理では、エンドキチナーゼ、グルカナーゼ、パーオキシダーゼ遺伝子の発現も抑制されることが明らかになった（図 8）。

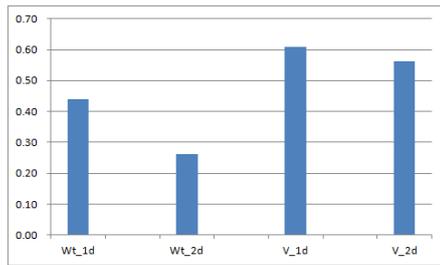


図8 誘導抵抗剤SAによるエンドキチナーゼ遺伝子の発現比較

これらの結果から、タイプ III エフェクターは、タイプ II 等の MAMP によって発現が誘導される各種転写因子、PR 遺伝子等の発現を抑制することが示唆された。すなわち、エフェクターは宿主の基礎的抵抗反応に関連する遺伝子発現を攪乱させ、感染成立させることにあると推察された。

本研究の成果として、感染過程におけるエフェクターの役割について、その概要を明らかにすることができた。しかしながら、エフェクターの実際の標的因子、相互作用については、未解明である。本研究で得られたエフェクターによって発現が影響される宿主の防御応答関連遺伝子、特に転写制御遺伝子については、今後の展望として、それらの恒常的発現あるいは発現抑制組換え体を作成し、宿主の基礎的抵抗反応について検討を行うことによって、さらに研究を深化させたい。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

① 落合弘和、イネ白葉枯病菌タイプ III エフェクターによって発現が影響されるイネ遺伝子の解析、日本植物病理学会、2010年4月19日、京都国際会館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

落合 弘和 (OCHIAI HIROKAZU)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学研究領域・主任研究員

研究者番号：3037646

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：