

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25年 5月 1日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580052

研究課題名（和文）70種類以上存在する青枯病菌エフェクターの網羅的機能解析

研究課題名（英文）Multiple deletion analysis of effector genes in *Ralstonia solanacearum*

研究代表者

大西 浩平（KOUHEI OHNISHI）

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：50211800

研究成果の概要（和文）：青枯病菌 OE1-1 株は 70 種類以上のエフェクター遺伝子を持つ。1 エフェクター遺伝子欠損株は *rsc0245* 変異株を除いて、いずれも宿主ナスに対し野生株と同等の病原性を示し、遺伝子機能の重複製が明らかとなった。エフェクターファミリー（7 GALA, 6 SKWP, 3 HLK）のそれぞれ及びすべての遺伝子を欠失した欠損株は、完全に病原力を失うことはなかった。またトマト、タバコに対する病原力の程度に違いが見られ、宿主特異性が存在していた。

研究成果の概要（英文）：*Ralstonia solanacearum* OE1-1 strain contains more than 70 effector genes. We deleted each effector gene, and the deletion mutant showed the same virulence on eggplant as the wild type, except the *rsc0245* mutant. We also deleted effector family genes, each of 7 gala, 6 SKWP, and 3 HLK, and all of 16 genes. All the deletion mutants still retained virulence, while they showed the difference phenotype on different hosts, tomato and tobacco.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：微生物分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：エフェクター、ゲノム、遺伝子、植物病理学

1. 研究開始当初の背景

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、土壤中において宿主植物の根から侵入し、細胞間隙でのコロニー化・増殖を経て、導管に

侵入後全身移行しながら菌体外多糖（EPS）を大量に生産し、宿主の導管内での水の移動を妨げ萎ちょう症状を引き起こす。青枯病菌による病徴発現には、III 型タンパク質分泌

装置の構築とそこから分泌されるエフェクターが必須である。これらのタンパク質をコードする遺伝子の発現は転写調節因子 HrpB によって *hrp* レギュロンとして包括的に調節されている。

青枯病菌 GMI1000 株の全ゲノム配列が決定され、エフェクターに特徴的な N 末端アミノ酸配列や、*hrp* レギュロン遺伝子上流に特徴的に存在する PIP (plant inducible promoter) box の有無、HrpB による発現誘導の有無などの解析から、74 種類のエフェクター遺伝子が推定されている。このうち、いくつかのエフェクターは実際に植物細胞内に分泌されることが証明されている。

我々は、科学研究費補助金特定領域研究「ゲノム」公募研究「青枯病菌の宿主域を決定する因子をゲノムの比較により解き明かす」により、日本株 OE1-1 のドラフトゲノム解析を行い、GMI1000 株と比較することにより、OE1-1 のエフェクター遺伝子を抽出した。その結果、GMI1000 株にはあるが OE1-1 株には存在しないエフェクターが 7 種類、OE1-1 にだけ存在するエフェクターが 1 種類あることが分かり、全体として OE1-1 に約 70 種類のエフェクターを同定した。

hrp クラスターに存在する 3 つのエフェクター遺伝子 *popABC* を欠損させた変異株は野生株 OE1-1 と同等の病原力を保持していることを示している。OE1-1 の 7 種類の GALA について、個々のエフェクター遺伝子を欠損させた変異株を作製し、タバコに感染させた (OE1-1 株はタバコに対して病原性を示す)。その結果、GMI1000 株の場合と同様に、GALA 変異株と野生株 OE1-1 の間には病原力に大きな差異はなかった。また GMI1000 やアメリカ大陸の青枯病菌において非病原性因子として知られているエフェクター AvrA は、OE1-1 をはじめとする日本株においては、HR の誘導

にはあまり関与していないことを明らかにした。

こうした、単一または複数のエフェクター遺伝子の変異しても、病原性には大きく影響しない現象は、前述したように他の植物病原細菌においても知られている。その原因としては、エフェクターが多数あるため個々のエフェクターの病原性への寄与が小さい、他のエフェクターによって変異が抑制 (suppress) されてしまう、などが考えられている。

いずれにしても、エフェクターが多種類ある状態では、個々のエフェクターの機能が隠れてしまうため、エフェクター 1 種類の状態を作ることが重要であると結論づけた。

2. 研究の目的

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は導管病を引き起こす植物病原細菌であり、III 型タンパク質分泌装置を介したエフェクターの宿主細胞への分泌が病原力の発現には必須である。青枯病菌は他の病原細菌よりもはるかに多種類のエフェクターを持つことがわかっているが、それぞれの機能はほとんど未解明である。そこで、本研究では日本株 OE1-1 の全エフェクター遺伝子の欠失変異株を構築し、これに個々のエフェクター遺伝子を加えた 1 エフェクター発現株を構築する。これら変異株の感染時における、宿主抵抗性遺伝子の発現や宿主が示す表現系を調べることにより、エフェクターの機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) エフェクター遺伝子欠損株の作製

ドラフトゲノム解析を行った青枯病菌日本株 OE1-1 には約 70 種類のエフェクター遺伝子が存在することを明らかにした。該当するエフェクター遺伝子の 5' 末端領域 500 bp、

3' 末端領域 500 bp を相同組換え用ベクター pK18mobsacB にクローニングした。このベクターは *sacB* 遺伝子を持ち、後述するようにスクロースによる選択可能となっている。また、接合伝達のための *oriT* を持っている。作製したプラスミドを伝達のための遺伝子を持った大腸菌 S17-1 に導入し、フィルター上での接合により、青枯病菌 OE1-1 由来株に導入した。pK18mobsacB は青枯病菌内では複製できないため、クローンした領域を利用した 1 回目の相同組換えによりプラスミド全体が青枯病菌ゲノムに挿入される。この段階では野生型エフェクター遺伝子と欠損遺伝子が部分二倍体として存在している。この細胞をスクロースを含む選択培地に塗布することで、2 回目の相同組換えにより *sacB* 遺伝子を脱落させた細胞だけが成育できる。その結果、該当するエフェクター遺伝子を欠損した株を獲得した。なお、遺伝子の欠失の確認は PCR 増幅断片の大きさならびに塩基配列によって行った。複数のエフェクターを欠失する場合には、同様の操作を繰り返した。

(2) エフェクター欠損株の植物体内における増殖能

(1) で構築した、種々のエフェクター遺伝子欠損株（欠失している遺伝子の数はさまざまである）を宿主であるタバコとナスの葉に葉肉注入し、菌数の変化を計時的に測定した。野生株である OE1-1 と欠損株の増殖能並びに欠損株同士の増殖能の違いを比較した。

(3) エフェクター欠損株の宿主に対する病原性解析

(1) で構築した、種々のエフェクター遺伝子欠損株を、宿主であるトマト、ナスとタバコに標準的な接種法である土壌に菌液を注入し根から感染させる方法で接種し、宿主

植物の病兆の進展を観察し、野生株との比較、欠損株同士の病原性を比較した。

4. 研究成果

(1) 1 エフェクター遺伝子欠損株の病原性

70 種類以上あるエフェクター遺伝子の 1 遺伝子欠損株を作製し、OE1-1 の宿主であるナスに根から接種したところ、*rsc0245* 変異株以外はいずれも親株と同等の病原性を示した。*rsc0245* 遺伝子産物は 3 型分泌系を通して植物細胞に注入されること、N-ribohydrolase motif を持つこと以外は、その機能についての詳細は不明である。今後機能解析を行っていく。また、1 エフェクター欠損株で顕著な表現系の変化が見られないことは、これまでに他の病原細菌や青枯病菌 GMI1000 株で報告されている結果とよく一致しており、遺伝子機能の重複を示している。

(2) GALA ファミリー遺伝子欠損株の病原性

OE1-1 株は 7 種類の GALA ファミリーエフェクター遺伝子を持つ。このうち、6 つを欠損させた、すわなち、1 つだけの GALA エフェクター遺伝子を持つ 7 株、すべての GALA エフェクター遺伝子すべてを欠損させた株を構築した。GMI1000 株で報告されているように、これらの変異株はいずれも宿主植物ナスに対する病原性を大きく低下させることはなかった。ナス植物内における細胞増殖能も親株と大きな違いは見られなかった。また、異なる宿主であるトマトやタバコに対する病原性も親株のそれと違いがなかった。

(3) HLK ファミリー遺伝子欠損株の病原性

OE1-1 株は 3 種類の HLK ファミリーエフェクター遺伝子を持つ。3 種類すべての HLK エフェクター遺伝子を欠損させた株はトマトに対する病原性が低下していた。また植物内

における増殖能も親株よりも劣っていた (図 1)。一方、他の宿主であるナスやタバコに対する病原性に大きな変化は見られなかった。

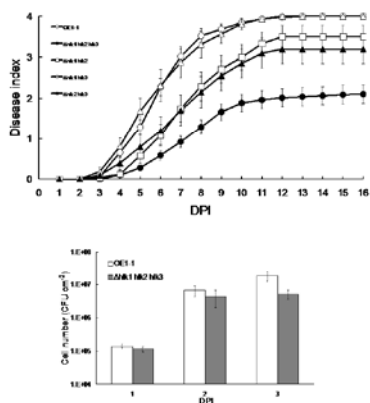


図 1

(4) SKWP ファミリー遺伝子欠損株の病原性
OE1-1 株は 6 種類の SKWP ファミリーエフェクター遺伝子を持つ。6 種類すべての SKWP エフェクター遺伝子を欠損させた株はナスに対する病原性が低下していた。また植物内での増殖能も低下していた (図 2)。一方でトマトに対する病原性は親株とほとんど変わらないものの、トマト植物内での増殖能は低下していた。タバコに対する病原性、タバコ植物内での増殖能は親株と変わらなかった。

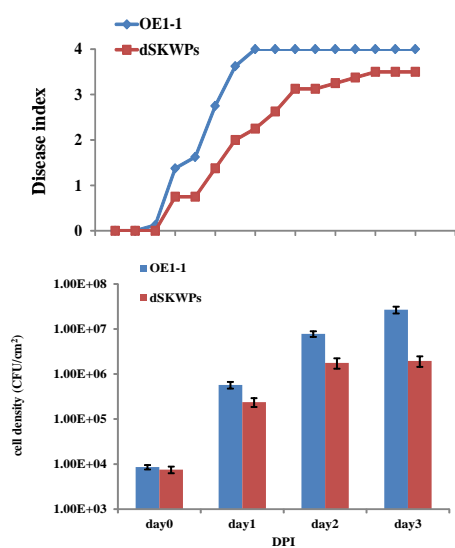


図 2

(5) 16 エフェクター遺伝子欠損株の病原性
GALA, HLK, SKWP エフェクターファミリー遺伝子すべてを欠損させた株を構築し、その病原性を検定したところ、病原性は弱くなっているものの、依然として病原性を保持していることが示された。今後は解析の残っている AWR ファミリーエフェクター遺伝子欠損株の構築、またすべてのエフェクター遺伝子欠損株の構築を行っていく。

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 10 件)

- ①. Functional analysis of *Ralstonia solanacearum* PrhG regulating the *hrp* regulon in host plants. Zhang Y., Chen L., Yoshimochi T., Kiba A., Hikichi Y., Ohnishi K. Microbiology in press (2013) doi: 10.1099/mic.0.067819-0 査読有
- ②. Implication of an aldehyde dehydrogenase gene and a phosphinothricin N-acetyltransferase gene in diversity of *Pseudomonas cichorii* virulence. Tanaka M., Wali U.M., Nakayashiki H., Fukuda T., Mizumoto H., Ohnishi K., Kiba A., Hikichi Y. Genes 3(1), 62-80 (2012) 査読有
- ③. Implication of *hrpW* in virulence of *Pseudomonas cichorii*. Kajihara S., Hojo H., Koyanagi M., Tanaka M., Mizumoto H., Ohnishi K., Kiba A., Hikichi Y. Plant Pathol., 61, 355-363 (2012) 査読有
- ④. *prhKLM* genes of *Ralstonia solanacearum* encode novel activators

of *hrp* regulon and are required for pathogenesis in tomato. Zhang Y., Kiba A., Hikichi Y., Ohnishi K. FEMS Microbiol. Lett. 317(1), 75-82 (2011) 査読有

- ⑤. S-glycoprotein-like protein regulates defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*. Maimbo M., Ohnishi K., Hikichi Y., Yoshioka H., Kiba A. Plant Physiol. 152, 2023-2035 (2010) 査読有

〔学会発表〕(計 59 件)

- ①. 陳立、木場章範、曳地康史、大西浩平、青枯病菌 SKWP ファミリーに属するエフェクターの解析、日本植物病理学会平成 25 年度大会、2013 年 3 月 28 日、岐阜大学 (岐阜市)
- ②. 大西浩平、張勇、曳地康史、青枯病菌日本株の 2 種類の非病原性因子がタバコにおける HR 誘導に関与する、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 19 日、幕張メッセ (千葉市)
- ③. Li Chen, Akinori Kiba, Yasufumi Hikichi, and Kouhei Ohnishi, Two avirulence effector genes of Japanese *Ralstonia solanacearum* strains are involved in pathogenicity to tobacco, 30th New Phytologist Symposium, Fallen Leaf Lake, California, USA, 2012 年 9 月 16 日
- ④. Li Chen, Akinori Kiba, Yasufumi Hikichi, and Kouhei Ohnishi, Involvement of effector genes *avrA* and *popPI* of Japanese *Ralstonia solanacearum* strains in pathogenicity to tobacco, 日本植物病

理学会平成 24 年度大会、福岡国際会議場 (福岡市), 2012 年 3 月 29 日

- ⑤. Li Chen, Akinori Kiba, Yasufumi Hikichi, and Kouhei Ohnishi, HLK effectors in *Ralstonia solanacearum* are essential for disease development in tomato, The 5th International Bacterial Wilt Symposium, Wuhan, China, 2011 年 6 月 21 日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-u.ac.jp/plant_healthcare/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 浩平 (KOUHEI OHNISHI)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：50211800

(2) 研究分担者

曳地 康史 (YASUFUMI HIKICHI)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：70291507

木場 章範 (AKINORI KIBA)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：50343314

(3) 連携研究者

なし