

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 6 月 17 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580053

研究課題名（和文）

植物・細菌両細胞で機能する白葉枯病菌タンパク質 LrpX による植物抵抗性の抑制機能

研究課題名（英文）

Functional analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* type III secretion Protein LrpX, which functions both in the plant and the bacterium

研究代表者

津下 誠治 (TSUGE SEIJI)

京府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：10254319

研究成果の概要（和文）：

イネ白葉枯病菌の LrpX はイネ細胞内において、XopR、XopY、XopAA といった他のエフェクターとともにイネの防御応答の抑制に関わるが、とくに本タンパク質は、リポキシゲナーゼと相互作用し、ジャスモン酸防御応答経路の阻害に関わることが示唆された。また、細菌細胞内においては、XrvB、Lon protease といった新規 *hrp* 制御因子の下流に位置し、本細菌の *hrp* 遺伝子発現の制御に関わることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

A *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* protein LrpX was found to function as an effector secreted through a type III secretion system into rice cells along with other effectors XopR, XopY and XopAA. Protein LrpX is likely to be associated with lipoxygenase and to represses the defense system via the jasmonate signaling cascade. Also, I identified two novel *hrp* regulators, XrvB and Lon protease, and found that LrpX also functions as a *hrp* negative regulator downstream of the proteins in the bacterial cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：イネ白葉枯病菌、*hrp*、エフェクター、植物—細菌相互作用

1. 研究開始当初の背景

一般に植物は、細菌を含めた微生物の侵入・増殖を防ぐためのシステムを保有している。一方、多くの植物病原細菌は、type

III と呼ばれるタンパク質分泌装置を介して数十種類にもおよぶ機能性タンパク質（エフェクター）を直接植物細胞内に導入し、これらの作用により植物の防御システムを

攪乱・打破することで、細菌自身の侵入・増殖を可能にする。このエフェクターを介した植物—細菌間の分子相互作用の解明は、研究開始当初から現在に至るまで世界で最も精力的に研究されているテーマの一つであるが、個々のエフェクターの機能に関しては、未だ知見が乏しい。

筆者は、イネの重要病原細菌のひとつである白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) について、エフェクターの網羅的同定に取り組み、18 の新規エフェクターを同定し、その機能解明にとりかかりつつあった。本研究課題で対象とした LrpX は、それらのひとつである。

LrpX は、エフェクターとして植物細胞内で、宿主の防御応答を阻害する機能が予想されていたが、その一方で、筆者は共同研究者とともに、LrpX が type III 分泌装置の構成成分をコードする *hrp* 遺伝子群の発現をも制御することを見出していた。*hrp* 遺伝子群の発現は複雑な制御ネットワークにより高度に制御されており、植物感染時に特異的に発現する。*hrp* 遺伝子の発現と、それによる type III 分泌装置の構築、さらに、それを介したエフェクターの分泌と宿主防御応答の攪乱・抑制といった一連の流れは、感染初期における細菌と植物との相互作用の中でもっとも重要な過程である。

その中で、LrpX は *hrp* 制御因子として、およびエフェクターとして2つの機能を併せもつ特異なタンパク質であることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、LrpX の *hrp* 遺伝子群の発現制御因子としての機能、および type III 分泌エフェクターとしての機能を明らかにすることを目的とした。これにより、未だ全貌が明らかになっていない *hrp* 発現制御ネットワークの解明において、新知見を加えることができる考えた。またさらに、筆者は、他の研究グループとともに、白葉枯病菌の他のエフェクターの機能解明も進め、エフェクターを介したイネ—白葉枯病菌間の分子相互作用の包括的解明を目指しているが、本課題はその一翼を担うものとして実施した。

3. 研究の方法

(1) LrpX による *hrp* 遺伝子発現制御

感染時における LrpX の *hrp* 遺伝子発現制御について調べるために、Cya レポーターシステムを用いて、LrpX 変異株におけるエフェクタータンパク質の分泌を調べた。また、

RT-PCR 法により各 *hrp* 遺伝子群の発現を調べた。また、トランスポゾンタギング法により新規 *hrp* 制御遺伝子を同定し、その機能を明らかにするとともに、それらの産物、および既知 *hrp* 制御タンパク質と、LrpX との相互作用について検討した。

(2) LrpX の植物細胞内における機能の解析

LrpX の植物細胞内における局在性を調べるために、LrpX と GFP との融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、Agrobacterium 法により *Nicotiana benthamiana* 葉に導入し、蛍光顕微鏡下で観察した。また、キチン処理したイネ培養細胞の cDNA ライブラリーを用いた酵母 two hybrid system を用いて、イネ細胞内へ導入された LrpX エフェクターが直接相互作用するイネ因子の同定を試みた。得られた候補因子については、植物細胞内における共発現、と免疫沈降法に供し、両者の相互作用を確認した。さらに、LrpX の一過発現系を利用することにより、本エフェクターによる植物の防御応答の抑制について検討した。また、LrpX 発現イネを作出し、その病害応答について調べた。

4. 研究成果

(1) LrpX による *hrp* 遺伝子発現制御

以前の研究により、LrpX はイネ白葉枯病菌の *hrp* 制御タンパク質 HrpG を負に制御することにより、他の *hrp* 遺伝子の発現を抑制することが示されている。本研究ではまず、LrpX の *hrp* 遺伝子群の発現制御が、感染時にも機能するかについて調べた。イネへの接種後、RT-PCR 法による各 *hrp* 遺伝子の発現、および Cya レポーターシステムによるエフェクタータンパク質の分泌を野生株と LrpX 変異株で比較したところ、両者で顕著な差は見られなかった。したがって、LrpX による *hrp* 遺伝子発現の抑制は、植物体への感染時においては機能しない、あるいは感染時には LrpX による負の制御が解除された状態にあることが示唆された。

本研究では、白葉枯病菌の新規 *hrp* 制御タンパク質として、XrvB と Lon protease を同定することができた。XrvB は histon-like nucleoid structuring (H-NS) protein として、Lon protease はセリンプロテアーゼとして、種々の細菌で環境の応じた遺伝子発現の制御に関わることが報告されている。今回、XrvB が *hrpG* の発現を抑制することにより、また、Lon protease がもう1つの *hrp* 制御因子である HrpX を分解することにより、その下流の LrpX をはじめとする遺伝子群およびエフェクター遺伝子群の発現を負に制御することを明らかにすることができた。

XrvB、Lon protease、および既に報告している HrpG の正の制御因子である Trh と LrpX との *hrp* 発現制御ネットワーク上における相互作用について検討した。各制御因子を欠損した変異株における、他遺伝子の発現を RT-PCR と GUS レポーターシステムにより調べたところ、XrvB、Lon protease、Trh の欠損はいずれも LrpX の発現に影響を与えるが、LrpX の変異が、3つの制御因子の発現に影響を与えることはなかった。

本研究により、白葉枯病菌の新規 *hrp* 制御因子として、XrvB と Lon protease を同定することができた。これらはいずれも LrpX と同様、*hrp* 遺伝子群の発現を負に制御している。XrvB と相同性をもつ H-NS は一般にターゲットとなる遺伝子のプロモーター部位に結合して、対象遺伝子の発現を抑制する。逆に、それがはずれることにより、下流の遺伝子の発現が誘導されることになる。XrvB は *hrp* 遺伝子のマスターレギュレーターである HrpG の発現を抑制していたが、*hrpG* プロモーターへの直接的な結合は見られず、その上位に位置する遺伝子の発現を制御しているようである。したがって、*hrp* 誘導条件下では未知遺伝子のプロモーター部位から XrvB がはずれ、その結果として HrpG を介して *hrpX*、さらには他の *hrp* 遺伝子群やエフェクター遺伝子群の発現が活性化されるようである。一方、*hrp* 非誘導条件、あるいは、植物体で感染が成立し、*hrp* 遺伝子群よりもむしろ、病原力に関わる遺伝子の発現が必要となった場合、Lon protease による HrpX の分解、さらには LrpX による HrpG の発現抑制によって、*hrp* 遺伝子群の発現を抑制することも推測された。このように、白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の発現制御に関して新たな因子とそれらを含めた新たなモデルを提唱することができたが、本制御系にはさらに多くの因子が介在するようである。今後、これらの新規因子の同定を含め、本制御ネットワークの全貌解明に向けてさらなる研究が必要である。

(2) LrpX の植物細胞内における機能の解析

白葉枯病菌の type III 分泌エフェクターのひとつである LrpX の植物細胞内における機能を明らかにする目的で、まず、35S プロモーター制御下で LrpX と GFP との融合タンパク質を発現するプラスミドを構築し、*Agrobacterium tumefaciens* を用いた一過発現系により、*N. benthamiana* において発現させた。処理 24 時間後、および 48 時間後に蛍光観察をおこなったところ、

LrpX::GFP の蛍光は植物細胞質内で粒状に分散して見られ、顕著な局在部位を決定することはできなかった。

一方、LrpX が相互作用するイネ因子を同定するために、酵母 two hybrid system を利用した。キチン処理したイネ培養細胞から調整した cDNA をターゲットとしてスクリーニングしたところ、いくつかのポジティブクローンが得られた。シーケンス解析の結果、その大部分はリポキシゲナーゼ遺伝子であったため、これを候補遺伝子として、prey と bait の交換、およびそれぞれの遺伝子を発現させた植物細胞からの共免疫沈降法により、LrpX とイネリポキシゲナーゼとの相互作用を確認した。

N. benthamiana における一過発現系を用い、LrpX 病害応答性遺伝子の発現抑制効果について real-time PCR により解析した。LrpX を発現させた後、白葉枯病菌 *hrp* 欠損変異株を処理したところ、LrpX 非発現時と比較して、ジャスモン酸経路により活性化される病害応答遺伝子を中心にその発現の抑制が見られた。また、LrpX を発現するイネを作出し、本形質転換イネに白葉枯病菌 *hrp* 欠損変異株を接種したところ、非形質転換イネ、および LrpX 非発現誘導イネと比較して、わずかではあるが、細菌増殖の増加が見られた。しかし、病害応答性遺伝子群の顕著な抑制を検出することはできなかった。

リポキシゲナーゼはジャスモン酸の生合成に関わる酵素遺伝子である。また、近年ジャスモン酸は白葉枯病菌に対する防御応答に関わることで報告されてきた。白葉枯病菌のもつ LrpX はリポキシゲナーゼに直接作用することにより、ジャスモン酸の生合成を阻害し、それによりイネの防御応答を抑制することで感染を可能にしていることが考えられた。

LrpX を欠損させた白葉枯病菌はイネへの病原力がわずかではあるが低下することを見出している。本研究の結果から、この病原力の低下については 2 つの可能性が考えられる。ナス科植物青枯病菌では、*hrp* 遺伝子群の発現は感染ごく初期に活性化され、その後、抑制され、かわりに菌体外多糖質や菌体外酵素の合成等、いわゆる病原力に関わる遺伝子の発現が活性化されると報告されている。イネ白葉枯病菌の *hrp* 遺伝子群の抑制に関わる LrpX は、青枯病菌で見られるような感染時における遺伝子発現のスイッチとして機能しているのかもしれない。そして LrpX ではこの遺伝子発現の切り換え

が不十分となり、病原力が低下している可能性が考えられる。一方で、上述のように、LrpXはtype III エフェクターとして植物細胞内でジャスモン酸の生合成経路を阻害していることが示唆された。LrpX 変異株では、植物の抵抗性に重要な役割を果たすジャスモン酸経路による防御応答を抑制することができず、その結果として病原力が低下した可能性も考えられる。今後これらの可能性の検証をすすめる必要がある。

(3) XopR, XopY, XopAA の機能の解析

type III 分泌エフェクターを介したイネ-白葉枯病菌間の分子相互作用の包括的解明に向けて、LrpX の機能解析と併せて、3つの白葉枯病菌エフェクター (XopR, XopY, XopAA) の機能解析に携わった。XopR 欠損白葉枯病菌は、宿主イネへの病原力が低下する。また、XopR 発現 *Arabidopsis* において、各種病害応答遺伝子の発現が低下することが見出され、本エフェクターが植物の防御応答を阻害することが明らかとなった。また、XopY および XopAA を欠損した変異株は、イネに対して顕著な病原力の低下は示さなかった。しかし、それらを発現するイネに type III 分泌装置欠損白葉枯病菌を接種したところ、細菌増殖の増加と病斑形成が見られた。酵母 two hybrid system を利用し、それらが相互作用するイネ因子を同定したところ、XopY はイネのレセプター様細胞質キナーゼ OsRLCK185 と、また、XopAA は OsBAK1 と相互作用することが明らかとなった。さらに、OsRLCK185 はイネのキチンレセプターである OsCERK1 の下流に位置し、防御応答に関わる MAP キナーゼの活性化に関わる信号伝達の機能をもつことが明らかとなった。

イネ白葉枯病菌 MAFF311018 系統は、少なくとも 32 のエフェクター遺伝子をもつ。筆者はこれらすべてについてそれらの遺伝子を欠損させた変異株を作出し、その病原力を検定した。その結果、野生株との病原力の差が認められたのは、LrpX を含めてわずか 4~5 つのエフェクター遺伝子欠損株だけであり、それらについてもわずかな病原力の低下が認められるにすぎない。しかし、本研究で対象とした 4 つのエフェクターは、それらを発現する植物体での解析結果から、その欠損変異株で病原力の低下が認められないものも含めて、いずれも植物の防御応答の抑制に関わっていた。今回解析を行っていない他のエフェクターについても、植物細胞内で何らかの機能をもつと予想され

る。一般に植物の防御応答関連遺伝子と発育・生育に関わる遺伝子の間には密接な関連があると言われている。実際に、本研究で対象としたエフェクター遺伝子だけでなく、他のエフェクター遺伝子についても、それを恒常的に発現する形質転換体では、多くの場合、生育異常が見られた。植物病原細菌は、多方面で機能するが、個々においてはそれほど作用力の強くないエフェクターを分泌・利用することにより、植物の極端な生育異常を引き起こすことを避けながら、その防御反応を抑制しているのかもしれない。

本研究により、type III 分泌エフェクターを介した白葉枯病菌の感染過程におけるイネとの分子相互作用の一端が明らかにされた。今後他のエフェクターの機能解明も含め、イネ-白葉枯病菌相互作用の包括的解明を進めていきたいと考えている。

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 Yumi Kametani-Ikawa, Seiji Tsuge, Ayako Furutani and Hirokazu Ochiai (2011) An H-NS-like protein involved in negative regulation of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. FEMS Microbiology Letters, 査読有, 319: 58-64. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02266.x
- ② Chiharu Akimoto-Tomiyama, Ayako Furutani, Seiji Tsuge, Erika J. Washington, Yoko Nishizawa, Eiichi Minami and Hirokazu Ochiai (2012) XopR, a type III effector secreted by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, suppresses microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 査読有, 25: 505-514. DOI: 10.1094/MPMI -06-11-0167
- ③ Koji Yamaguchi, Kenta Yamada, Kazuya Ishikawa, Satomi Yoshimura, Nagao Hayashi, Kouhei Uchihashi, Nobuaki Ishihama, Mitsuko Kishi-Kaboshi, Akira Takahashi, Seiji Tsuge, Hirokazu Ochiai, Yasuomi Tada, Ko Shimamoto, Hirofumi Yoshioka and Tsutomu Kawasaki (2013) A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is

directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. Cell Host & Microbe, 査読有, 13: 347-357. DOI: 10.1016/j.chom. 2013.02.007

- ④ Koji Yamaguchi, Yusuke Nakamura, Kazuya Ishikawa, Yuya Yoshimura, Seiji Tsuge and Tsutomu Kawasaki (2003) Suppression of rice immunity by *Xanthomonas oryzae* type III effector Xoo2875. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 査読有, 77: 796-801. DOI: 10.1271/ bbb.120929

[学会発表] (計 4 件)

- ①石川和也, 「ユビキチンリガーゼである OsPUB44 の植物免疫における機能解析」, 平成 25 年度 日本植物病理学会大会, 2013 年 3 月 28 日, 岐阜市

- ②亀谷 (伊川) 有美, 「イネ白葉枯病菌の Lon プロテアーゼは *hrp* 遺伝子発現の負の制御に関与する」, 平成 24 年度 日本植物病理学会関西西部会, 2012 年 9 月 27 日, 鳥取市

- ③津下誠治, 「イネ白葉枯病菌の環境応答と病原性に関わる遺伝子発現機構」, 平成 24 年度 植物感染生理談話会, 2012 年 8 月 30 日, 近江八幡市

- ④Yumi Kametani-Ikawa, 「Involvement of H-NS-like protein XrvB in the negative regulation of *hrp* genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*」, 第13回国際細菌・応用微生物学会, 2011年9月日, 札幌市

[その他]

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/plan_t_path/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津下誠治 (TSUGE SEIJI)

京都府立大学・生命環境科学研究科

・准教授

研究者番号 : 10254319