

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450062

研究課題名(和文) 白葉枯病菌TALエフェクター群によるイネの感受性誘導機構とその多様性に関する研究

研究課題名(英文) Study on mechanisms of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* TAL effectors on induction of rice susceptibility to the bacterium

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(系)・准教授

研究者番号：10254319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：白葉枯病菌は構造が極めて類似した10数種のTALエフェクターをイネ細胞内に分泌する。本エフェクターは各々異なるイネ遺伝子の発現を活性化することにより、本細菌への感受性、あるいは逆に抵抗性を高める。本研究では本細菌MAFF311018系統のもつ15種類のTALエフェクターのうち、ショ糖排出に関わるイネ遺伝子を標的とする2つを欠損させた場合、その病原性を喪失することを明らかにした。このことは、これらのTALエフェクターを介したイネ体内でのショ糖の獲得が、本細菌の病原性に必須であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Xanthomonas oryzae pv. oryzae MAFF311018 produces 15 transcriptional activator-like (TAL) effectors, which are directly secreted into rice cells via the type III secretion system and, there, activates susceptibility- or resistance-related rice genes. We analyzed importance of each TAL effector in virulence of the bacterium and found that the mutant lacking two TAL effector genes completely lost bacterial virulence on rice. Previous reports showed that both genes activate sucrose transporter gene OsSWEET11 and OsSWEET13, respectively. The results suggest that acquisition of sucrose by activating rice sucrose transporters is essential for virulence of *X. oryzae* pv. *oryzae*.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ白葉枯病菌 エフェクター hrp 病原性・非病原性

1. 研究開始当初の背景

白葉枯病菌はイネの重要病原細菌であり、熱帯アジアを中心に世界の稲作地帯で大きな被害をもたらしている。本細菌を含め多くの植物病原細菌は、その病原性の発揮に *hrp* 遺伝子群と呼ばれる一連の遺伝子が必須である。本遺伝子群は type III タンパク質分泌装置の構築に関わり、本装置を介して細菌は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を直接植物細胞内に分泌する。個々のエフェクターは、植物が本来持つ微生物に対する抵抗性（基礎的抵抗性）の抑制・攪乱、あるいは感受性遺伝子の発現誘導のためにそれぞれ機能し、その結果として、病原細菌は植物細胞内で増殖し、発病に至らしめる。

一般に1つの細菌は、数十から百数十種に及ぶエフェクターを生産するが、それぞれのエフェクター遺伝子を欠損させた変異株は概して野生株と同程度の病原力を保持する。したがって、個々のエフェクターの作用は必ずしも大きくなく、それらの相加・相乗的な効果により、植物の抵抗性が抑制、あるいは感受性が誘導されると考えられている。

一方、これらのエフェクターを認識することで植物がより強力な抵抗性をもつこともあり、この場合、そのエフェクターは非病原力因子として機能することとなる。

個々のエフェクターは一般に、それぞれ異なる機能と構造をもつが、中には極めて類似した構造と機能を持つ一連のエフェクター群もあり、その代表として TAL (transcriptional activator-like) エフェクターがある。これは、白葉枯病菌を含む *Xanthomonas* 属細菌にのみ存在しており、中央部に 34 アミノ酸を一つの単位とする反復から成る領域と、その後ろに真核生物細胞内で機能する核局在化シグナルと転写活性化領域により構成されている。これまでに *Xanthomonas* 属細菌から数十の TAL エフェクターが見つかった。それらは極めて高い相同性をもつが、反復回数と、各反復単位の 12、13 番目のアミノ酸の組み合わせについては個々に違いが見られる。TAL エフェクターは植物細胞内に分泌された後、核に移行し、そこでそれぞれの TAL エフェクターがターゲットとする宿主の感受性の増大に関わる遺伝子、あるいは逆に抵抗性に関わる遺伝子のプロモーター配列に結合し、その下流の遺伝子の発現を活性化する。近年、この 12、13 番目のアミノ酸の組み合わせとその単位の反復によって、本エフェクターが結合する DNA 配列が決定されることが明らかとなった。

個々のイネ白葉枯病菌系統は、TAL エフェクターを十数個もつが、それぞれどのような TAL エフェクターの組み合わせをもつかについては多様性に富んでいる。つまり、各白葉枯病菌系統は、それぞれがもつ多様な TAL エフェクターを駆使し、植物の感受性に関わ

る遺伝子を活性化することで病原力を発揮しているようである。

2. 研究の目的

我が国で単離され、世界に先駆けて全ゲノム塩基配列が決定された白葉枯病菌 MAFF311018 系統は、15 個の TAL エフェクターをもつ。本研究では、これらの TAL エフェクターの中からその病原力への関与が大きいものを同定し、その機能を解析するとともに、それらの非病原力因子としての機能についても明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究の方法

白葉枯病菌 MAFF311018 系統のもつ 15 個のエフェクター遺伝子は、1~4 個がクラスターを形成し、ゲノム上の 6 か所に分散して存在している (クラスター I: 4 個、II: 3 個、III: 2 個、IV: 2 個、V: 3 個、VI: 1 個)。そこで、まず、各クラスターを欠損した 6 種類の変異株を作成し、感受性イネ品種への病原力の低下、あるいは抵抗性イネ品種に対する抵抗性誘導能の低下を調べた。また、すべてのクラスターを欠損させた変異株を含め、複数のクラスターを欠損させた多重欠損株についても作成し、その病原力への関与を調べた。また、病原力への関与が大きいことが明らかとなった変異株については、そこで欠損した TAL エフェクター遺伝子のいずれがそれに寄与しているのかについて詳細に検討した。

一方、TAL エフェクターの非病原力因子としての機能を調べるために、白葉枯病菌に対する抵抗性遺伝子の一つずつもつイネ品種に対して、TAL クラスター欠損変異株を処理し、抵抗反応の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) TAL エフェクターの病原力への関与

I から VI の各 TAL クラスターを一つずつ欠損させた白葉枯病菌 MAFF311018 由来の変異株を親和性イネ品種 IR24 に接種したところ、クラスター I の欠損変異株を除き、いずれも野生株とほぼ同程度の病原力を示した

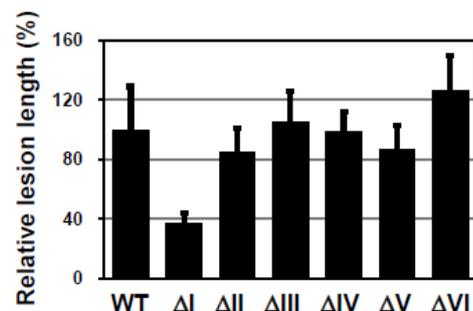


図1. 各 TAL クラスター欠損変異株の病原力

(図1)。しかし、複数の TAL クラスターを欠損させた多重変異株では、欠損させたクラスターの数に応じて病原力の低下が見られた。そしてすべての TAL クラスターを欠損させた変異株では病斑形成が全く見られなかった(図2)。これらの結果から、一般に一つの TAL エフェクターの病原力に及ぼす影響は必ずしも大きくないが、それらは相加・相乗的に作用することで本細菌の病原力に関与することが明らかとなった。

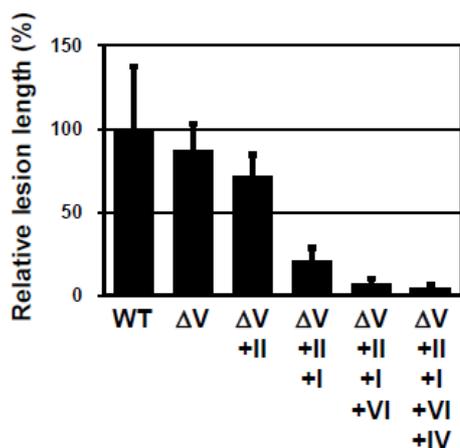


図2. TAL クラスター多重欠損株の病原力

また、クラスターIには *XOO1132*, *XOO1134*, *XOO1136*, および *XOO1138* の4つの TAL 遺伝子が含まれている。これらの単独、および二重欠損変異株の病原力を調べたところ、*XOO1136* と *XOO1138* の二重欠損株のみで、病原力の低下が見られた。これまでに *XOO1136* と *XOO1138* の2つのエフェクターがイネのどのような遺伝子の発現活性化に関わるかについては、明らかになっていない。今後これらがターゲットとするイネ遺伝子の同定と、その感受性増大に関わる機能について明らかにする必要がある。

(2) *AvrXa7* と *PthXo2* は MAFF311018 の病原性に必須である。

前述のように、TAL クラスターV と VI は、それぞれ単独での欠損では本細菌の病原力にほとんど影響を与えない。しかし、これら2つのクラスターを同時に欠損させた変異株では、イネ品種 IR24 に対する病原性がほぼ完全に失われることを見いだした(図3)。クラスターVには *XOO2865*, *XOO2866*, および *XOO2868* の3つの TAL 遺伝子が、そしてクラスターVIには1つの TAL 遺伝子 *XOO4014* が含まれる。したがって、本結果はクラスターVに含まれるいずれかの TAL 遺伝子とクラスターVIの *XOO4014* が協調的に機能し、病原性に必須の役割を果たしていることが示唆している。このことを確認するために、これらの遺伝子をクローニングした後、クラスターV および VI の二重欠損株に導入し、その病原性の回復を調べた。その結果、

クラスターVに含まれる *XOO2868* とクラスターVIに含まれる *XOO4014* を導入したときにのみ病原性の完全な回復が見られ、これらの遺伝子の少なくとも一方をもつことが、白葉枯病菌 MAFF311018 系統のイネ品種 IR24 に対する病原性に必須であることが示された。

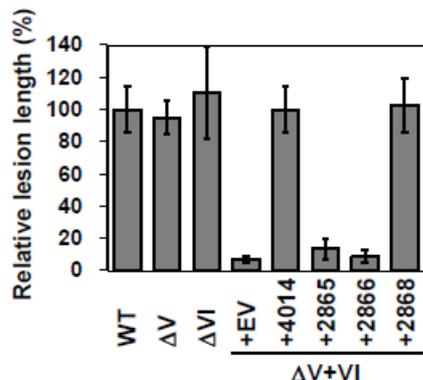


図3. TAL クラスター V + VI 二重欠損変異株の病原力の低下と相補試験

ゲノムデータベースおよびシークエンス解析の結果より、*XOO2868* と *XOO4014* はそれぞれ、他の白葉枯病菌系統で同定されている、*AvrXa7* と *PthXo2* と同一であることがわかった。また近年、米国の研究グループから、*AvrXa7* と *PthXo2* はそれぞれイネの2つの異なるシュークローストランスポーター遺伝子である *OsSWEET11* と *OsSWEET13* をターゲットとし、それらの発現を活性化させることが報告された。これらの知見、および本研究の結果から、白葉枯病菌のイネへの病原性には、TAL エフェクターによる、イネシュークローストランスポーター遺伝子の活性化と、それに伴うイネ細胞内から細菌の存在する細胞外へのシュークロースの排出促進が必須であることが示唆された。白葉枯病菌が存在するイネ葉導管内は極めて栄養の乏しい環境である。そのような環境での旺盛な増殖を可能にするために、本細菌はイネ細胞からシュークロースを排出させ、それを利用していると考えられる。

AvrXa7 は海外の系統も含めて多くの白葉枯病菌系統で保存されている。これまで、いくつかの系統では、*AvrXa7* 欠損株は IR24 への病原力が著しく低下するとの報告がなされてきた。しかし、MAFF311018 系統では、*AvrXa7* の欠損による IR24 への病原力の低下は見られなかった(図1)。これは MAFF311018 系統が *OsSWEET11* を活性化する *AvrXa7*(*XOO2868*) だけではなく、*OsSWEET13* を活性化する *PthXo2* (*XOO4014*) も併せ持つことにより、*AvrXa7* を欠損した場合にも、必要かつ十分なシュークロースを獲得できるためと考えられる。

一方、*Indica* 品種の IR24 とは異なり、*Japonica* 品種では一般に、*OsSWEET13* のプロモーター領域に *PthXo2* の結合配列が存在し

ないことが報告されている。MAFF311018 系統の *XO02868 (avrXa7)* 欠損株を作出し、*Japonica* 品種金南風への接種を行ったところ、その病原力が著しく低下することが確認された。

先述のように、白葉枯病菌は複数の TAL エフェクターをもち、また、どのような TAL エフェクターをもつかは系統ごとに多様性が見られる。この多様性は地域ごとに異なるイネ品種に対応するために生じたものであり、また、同時にイネと白葉枯病菌との共進化の結果生じたものと考えられる。また、個々の TAL エフェクターも多様なイネ遺伝子をターゲットとすることが明らかとなってきたが、本研究により、その中でもとくにイネのシュークローストランスポーター遺伝子の活性化は、病原性においてとくに重要であることが示された。

(3) TAL エフェクターの非病原性因子としての機能

これまでに、いくつかの TAL エフェクターがイネの抵抗性に関わる遺伝子を活性化することにより、非病原性因子として機能することが報告されてきた。MAFF311018 系統は抵抗性遺伝子 *Xa1*, *Xa2*, *Xa3*, *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *Xa8*, あるいは *xa13* をもつイネ品種に対して非親和性である。したがって、これらの抵抗性遺伝子に対応する非病原性因子をもち、それが、本細菌系統のもつ TAL エフェクターであることも考えられる。そこで、先述の各 TAL クラスター欠損変異株を、上記の抵抗性遺伝子の一つずつもつイネ品種に処理し、各変異株がそれらのイネ品種に対する抵抗誘導能を喪失するかについて調べた。その結果、*avrXa7* を含むクラスター V を欠損した変異株では、予想通り非病原性遺伝子 *avrXa7* に対応する抵抗性遺伝子である *Xa7* をもつイネ品種に対する抵抗性誘導能を喪失していたが、それ以外についてはすべて、野生株と同様の抵抗反応が見られた。したがって、本細菌系統のもつ TAL エフェクターには、*avrXa7* 以外、上記の抵抗性遺伝子に対応する非病原性遺伝子は含まれていないことが示唆された。

しかし、本研究では、いずれの TAL クラスターを欠損させた変異株も抵抗性遺伝子 *Xa1* をもつイネに強力な抵抗反応の 1 つである過敏感反応(HR)を引き起こすにもかかわらず、すべての TAL クラスターを欠損させた変異株では、HR が見られないことを見出した。さらに、クラスター I~VI のいずれか一つだけをもち、それ以外を欠損させた変異株を作出したところ、いずれのクラスターをもつものも全て *Xa1* をもつイネに HR を引き起こした。

これらの結果は、*Xa1* 抵抗性に対する TAL エフェクターの何らかの関与を示唆しているが、現時点においてその詳細は明らかでない。しかし、筆者はこれに関して以下の仮説を考えている。(i) それぞれの TAL エフェク

ターは反復領域にわずかな差異はあるものの、それ以外の構造はほぼ同一であることから、その TAL の共通した構造が *Xa1* により直接的、あるいは間接的に認識され、抵抗性反応が誘導される。(ii) *Xa1* をもつイネ品種に対して親和性となる細菌系統も TAL エフェクターをもち、同様に *Xa1* により認識されるが、これらの系統は、*Xa1* を介した抵抗性誘導機構を抑制・阻害する未知因子をもち、

上に示したように、TAL エフェクターは白葉枯病菌の病原性において必須のようである。したがって、本細菌に対する抵抗性に関して、TAL エフェクターを認識する抵抗性誘導機構の獲得は宿主イネにとって最も望ましいと考えられる。今後、*Xa1* をもつイネ品種に親和性の細菌系統を材料とし、その突然変異株の作出を通して上記の仮説の鍵となる「未知因子」の存在の有無を明らかにし、さらに TAL エフェクターを介した新規の白葉枯病菌に対する新規のイネ抵抗性機構を明らかにしたいと考えている。

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)

[学会発表](計 2 件)

Seiji Tsuge 他 2 名. Importance of Sugars and Sugar Metabolism-related Genes in *hpr* Gene Expression and Virulence of the Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. The 6th International Conference on Plant, Pathogen and People. 2016 年 2 月 24 日. New Delhi

津下誠治 他 2 名. イネ白葉枯病菌 MAFF311018 株のもつ TAL エフェクターの病原性への関与. 平成 27 年度 日本植物病理学会関西支部会. 2015 年 9 月 29 日. 徳島

[その他]

ホームページ等

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

(4) 研究協力者

宇佐美 真央 (USAMI, Mao)

伊川 有美 (IKAWA, Yumi)