

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450104

研究課題名(和文) 酵母遺伝学的解析系を用いた植物病原菌エフェクターの分子機能の解明とその応用

研究課題名(英文) Functional analysis of plant pathogen effector proteins in yeast and its application

研究代表者

田淵 光昭 (Tabuchi, Mitsuaki)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：00294637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原性細菌 青枯病菌は、型分泌装置と呼ばれる注射針様の構造物を用いて宿主細胞中に70種類以上ものエフェクターを注入する。エフェクターは、多様な分子機能により宿主細胞の機能を攪乱する。エフェクターの分子機能の解明は、青枯病菌の感染戦略を理解する上でも重要である。本研究で、我々は、ChaCドメインを有するエフェクターRipAYが植物においては病原菌に対する防除免疫の活性化に必須なグルタチオンを特異的に分解する活性を有する新規なエフェクターであることを明らかにした。また、興味深いことにRipAYは、植物において免疫応答の活性化に必須なチオレドキシンにより特異的に活性化されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* injects more than 70 effector proteins into the host plant cells via needle-like structure of a type III secretion system. The effector proteins manipulate host cellular functions with diverse molecular activities. The understanding of the molecular function of effectors is essential to uncover the molecular mechanism for pathogenesis of *R. solanacearum*-infection. Here, we show that a ChaC-like domain containing effector RipAY from *R. solanacearum* exhibits γ -glutamyl cyclotransferase (GGCT) activity to degrade the major intracellular redox buffer, glutathione, which is known to be crucial for a proper activation of host immune defense in plants. Intriguingly, RipAY protein exhibits a robust GGCT activity by the interaction with eukaryotic thioredoxins, which are also important for intracellular redox homeostasis during bacterial infection in plants.

研究分野：応用微生物学

キーワード：病原菌エフェクター グルタチオン 酵母 チオレドキシン 青枯病菌

1. 研究開始当初の背景

多くのグラム陰性病原性細菌は、エフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞中に型分泌装置を使って注入することが知られている。エフェクターは宿主細胞内の様々な細胞機能を阻害することにより宿主免疫応答を攪乱することで感染に有利な環境の構築に機能している。しかし、エフェクターの多くは宿主との相互作用の過程で独自に進化獲得されたと推定されるものが多く、一次構造から機能を推定することが困難な状況にある。

酵母は単細胞真核生物であり、細胞機能の多くが高等真核生物と類似していることが知られており、これまで真核生物のモデルとして広く用いられてきた。エフェクターの一部は、酵母で発現させるとエフェクター標的の酵母カウンターパートに作用することで酵母に増殖阻害等の表現型を引き起こすことが示されており、エフェクター機能の解明に酵母発現系が有用であることが証明されている。

青枯病菌は、ナス科植物をはじめとする200種以上もの植物に感染し、枯死させる農業上最も深刻な被害をもたらす植物病原性細菌の一つであり、その宿主域の広さに対応して70種類以上もの多くのエフェクターを有する。

2. 研究の目的

我々は、青枯病菌の感染戦略の理解のため、青枯病菌エフェクターの分子機能を明らかにすることを目的として、これまで酵母発現系を用いて青枯病菌エフェクターの機能解析を行ってきた。これまでに、青枯病菌エフェクターの内、36個を酵母で過剰発現させ、8個のエフェクターが酵母に増殖阻害を引き起こすことを見出している。本研究では、8個のエフェクターの内、ChaCドメインと呼ばれるすべての生物に保存された機能未知ドメインを有するエフェクターRipAYについて機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) RipAYの構造予測

RipAYの推定三次構造については、RipAYの一次構造配列についてタンパク質構造予測サイトPhyre2を用いて行った。

(2) 酵母発現系によるRipAYの機能解析

構造予測により推定されたRipAYの機能を元に各種変異体を作製し、これら変異体の機能についてガラクトース誘導性プロモーター(*P_{GAL1}*)を用いた酵母発現系を用いて、発現誘導時と非誘導時の増殖をスポットアッセイにより評価した。

(3) 大腸菌を用いた組換えタンパク質の発現

RipAYおよびRipAY活性化因子として同定された青枯病菌、酵母、植物由来チオレドキシシン(Trx)を大腸菌発現ベクターpET23dもしくはpDEST17に組込み、大腸菌Rosetta gami B (DE3) pLysS株においてヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、Ni-キレートカラムを用いて精製した。精製後のタンパク質はmicroBCAアッセイにより定量した。

(4) グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)活性の測定

GGCT活性は、グルタチオン(GSH)を基質としてGGCT活性により遊離したCys-Glyジペプチドを酵母Cys-GlyジペプチドペプチダーゼDug1を用いた反応により最終的に遊離したシステインを酸性ニンヒドリンにより検出し、遊離したシステイン量を基に活性を測定した。

(5) 細胞内GSH濃度の測定

酵母およびナス葉のGSH濃度については、DTNBとGSH還元酵素を用いた呈色反応により測定した。

(6) 青枯病菌のナス葉への感染実験

青枯病菌野生株およびRipAY欠損株(*ripAY*)の菌体懸濁液をシリンジによりナス葉に感染させた。GSHの定量には感染後1日の感染葉を用いた。

(7) 酵母タンパク質からのRipAY活性化因子の同定

大腸菌で発現させたGGCT活性を持たない不活性なRipAYについて、酵母タンパク質の中からRipAYのGGCT活性を活性化させるタンパク質を精製した。具体的には酵母約10gをフレンチプレスにより破碎することでタンパク質を抽出し、酵母タンパク質粗抽出液からRipAYの活性化を指標に活性化因子をHiPrep DEAE FF 16/10イオン交換カラム、HiPrep Butyl FF 16/10疎水性相互作用カラム、HiPrep 16/60 Sephacryl 200ゲルろ過カラムを用いたクロマトグラフィーにより順次精製し、最終的に単一バンドにまで精製した。精製した推定のRipAY活性化因子はLC-MS/MSにより同定した。

4. 研究成果

(1) RipAYはGGCTと構造上の類似性を示す

RipAYの一次構造配列を基に機能の推定を試みた。RipAYは、モチーフ検索の結果、分子中央部にChaCドメインと呼ばれる全ての生物に保存された機能未知ドメインを有していた。そこでRipAYの機能を予

測することを目的にタンパク質構造予測サイト Phyre2 を用いて三次構造を予測したところ、推定の RipAY 三次構造は、ヒト由来 GGCT と高い構造上の類似性が見られた。また、GGCT の推定の基質認識モチーフ (YxSL 配列) や推定の活性部位であるグルタミン酸も高度に保存されていた。GGCT は、GSH などの グルタミル化合物の グルタミル結合を切断する活性を有する酵素であり、細胞内では GSH 代謝に関わることが知られている。

(2) RipAY は酵母細胞内で GGCT 活性を有し、酵母細胞内 GSH を低下させる

最近、Kumar ら (Kumar et al., *EMBO rep.*, **13**: 1095-1010, 2012) は、ChaC ドメインを有する酵母およびヒトタンパク質が GSH 特異的な GGCT 活性を有することを報告した。RipAY は ChaC ドメインを有するが、酵母およびヒト ChaC タンパク質とはそれほど高い相同性を有していなかった (数%から十数%程度の相同性)。しかし、推定三次構造から RipAY も、GGCT 活性を有することが予測された。そこで推定の活性部位である 216 番目のグルタミン酸をグルタミンに変異させた E216Q 変異体、また、推定基質認識モチーフである YxSL 配列変異体、Y129A, L130A, S131A, L132A 変異体を作製し、酵母細胞に導入した。その結果、E216Q 変異体では、野生型 RipAY で見られた増殖阻害が完全に回復していた。

また、Y129A, S131A, L132A 変異体でもほぼ増殖阻害は見られなかった。一方、GGCT とは配列の異なる L130A 変異体ではほとんど増殖阻害の回復は見られなかった。また、RipAY にプロテイン A タグを付加した融合タンパク質として酵母で発現させ、発現タンパク質を IgG ビーズで簡易精製した後にビーズに結合した RipAY の GGCT 活性を測定したところ、極めて高い GGCT 活性が検出された。これより、RipAY は酵母細胞内で高い GGCT 活性を有し、その活性により酵母細胞内 GSH 濃度を低下させることで増殖阻害を引き起こしていることが推察された。これより RipAY は、ChaC ドメインに由来する GGCT 活性を介して酵母に増殖阻害を引き起こしていることが示唆された。

(3) RipAY による酵母増殖阻害は培地への GSH の添加により回復しない

RipAY の GGCT 活性に依存した酵母細胞内 GSH 濃度の低下と増殖阻害には相関性が見られたことより、RipAY による酵母増殖阻害は、GSH の枯渇に伴うことが考えられた。そこで、RipAY による酵母増殖阻害が培地への GSH により回復するかを調べた。その結果、RipAY による酵母増殖阻害は、培地への GSH の添加によって回復せず、また、GSH の酵母細胞内への取り込みを上昇させるために RipAY と同時に酵母形質膜 GSH 輸送体

である Hgt1 を過剰に発現させても RipAY による酵母増殖阻害は回復しなかった。また、Hgt1 を過剰発現させた酵母では RipAY による GSH 濃度の低下は回復していたことから RipAY による増殖阻害は、RipAY の GGCT 活性に依存するが、細胞内 GSH の低下には依存しないことが明らかになった。これより少なくとも酵母増殖阻害においては、GSH 以外の未知の グルタミル化合物を RipAY が GGCT 活性に依存して分解することにより増殖阻害を引き起こしていることが推察された。

(4) 青枯病菌感染ナス葉では細胞内 GSH が低下する

次に青枯病菌感染時において RipAY は宿主 GSH を分解している可能性について検討した。青枯病菌野生株および RipAY 欠損株 (*ripAY*) (高知大学・大西浩平 博士から分与) をナス葉に感染させ、感染 1 日後の感染葉の細胞内 GSH 濃度を測定した。その結果、野生株では青枯病菌を接種していないコントロールと比べて細胞内 GSH 濃度が 40% 程度にまで減少した。一方、*ripAY* 株では、細胞内 GSH 濃度はコントロールと同程度にまで回復していた。これより RipAY は、青枯病菌感染時において宿主細胞内 GSH を低下させることが明らかとなった。

(5) RipAY は不活性型として合成され、宿主真核生物由来活性化因子により活性化される

RipAY の GGCT 活性をより詳細に解析するため、RipAY をヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ組換えタンパク質を精製した。また、コントロールとして GGCT 活性を有することが知られる酵母 ChaC タンパク質である Gcg1 を同様に大腸菌でヒスチジンタグ融合組換えタンパク質として精製した。

試験管内における GSH 分解活性を測定したところ、組換え Gcg1 は高い GGCT 活性が検出されたが、大腸菌で発現精製した RipAY は全く GGCT 活性を有さなかった。酵母細胞内で発現させた RipAY は高い GGCT 活性を有することから酵母内には RipAY を活性化させる活性化因子が存在することが推測された。そこで、不活性な RipAY タンパク質に酵母タンパク質抽出液を添加したところ、酵母タンパク質抽出液に依存して GGCT 活性の上昇が見られた。また、この活性化は植物 (*Arabidopsis* およびナス) またヒト培養細胞 (HeLa) 抽出液によっても見られたが、青枯病菌のタンパク質抽出液ではそのような活性化は見られなかった。これより、RipAY は真核生物中に存在する何らかの因子により活性化することが推測された。

(6) RipAY は、真核生物型 Trx と結合することにより活性化される

RipAY の活性化因子を同定するため、酵母菌体 10 g からタンパク質を抽出し、各種クロマトグラフィーにより RipAY の活性化を指標にして活性化因子の同定を試みた。その結果、酵母細胞質チオレドキシシン Trx1, Trx2 が RipAY の活性化因子として同定された。そこで、大腸菌で発現させた Trx1 を同じく大腸菌で発現させた RipAY と反応させると RipAY の GGCT 活性が添加した Trx1 量に依存して活性化することを見出した。また、Trx1 と RipAY は酵母ツーハイブリッド法により相互作用が見出された。さらに、Arabidopsis 由来の細胞質チオレドキシシン h-type (AtTrx h2, AtTrx h3, AtTrx h5) および青枯病菌由来 Trx (RsTrxA) について RipAY との相互作用および活性化能を調べたところ、RipAY は、AtTrx h5 と最も強く結合し、活性化されることが明らかになった。興味深いことに AtTrx h5 は、病原菌感染時に特異的に発現が上昇することが明らかになっている。しかし、RsTrxA とは相互作用も活性化も見られなかった。これより、RipAY は、真核生物型 Trx と特異的に相互作用することにより活性化することが明らかになった。

さらに、AtTrx h5 を用いて RipAY との相互作用メカニズムについて解析した。Trx は、活性中心に 2 つのシステイン残基を有しておりシステイン残基に由来するチオール基がその活性に不可欠である。RipAY には一つのシステイン残基が存在することより Trx は RipAY 分子間のチオール基の還元を介して活性化していることが考えられた。そこで、AtTrx h5 の活性中心の 2 つのシステイン残基をセリンに変異させた変異体 AtTrx h5 C39S, C42S 変異体および RipAY C313S 変異体を作製し、これらを用いて RipAY と AtTrx h5 都の相互作用を調べた。RipAY C313S 変異体では、AtTrx h5 と野生型 RipAY と同程度の結合および活性化を示した。これより、RipAY の活性化に RipAY のシステイン残基の還元は不要であることが明らかとなった。また、AtTrx h5 C39S+C42S 変異体については、RipAY との相互作用は低下し、また、活性化能も低下したが、これらの能力については完全に消失することはなかった。これより、AtTrx h5 の活性中心は、RipAY との結合そして活性化には必須ではないが、AtTrx h5 の構造が RipAY との結合およびそれに伴う活性化に必要であることが推察された。

次に、AtTrx h5 により活性化させた RipAY と酵母由来 GGCT である Gcg1 について GSH を基質として酵素学的所性質の比較を行った。その結果、活性型 RipAY は、KM 値は、Gcg1 とそれほど大きな差はなかったが、Kcat 値が Gcg1 と比較して著しく高く、酵素の触媒効率を表す Kcat/KM 値では、活性型 RipAY は、Gcg1 の 94 倍もの高い活性を有することが明らかになった。また、最

近報告された Arabidopsis 由来の ChaC タンパク質と比較しても 67 倍から 1000 倍もの高い触媒効率を有することが明らかになった。これより、RipAY は、青枯病菌感染時において青枯病菌から宿主細胞に注入され、宿主細胞内の Trx (特に Trx h5) と相互作用することにより活性化し、極めて高い GGCT 活性を発揮し、これにより宿主内の GSH を枯渇させることで免疫応答を攪乱させるのではないかと考えられた。Arabidopsis では GSH が合成できない pad2-1 変異体ではグルタチオン合成能の低下に伴い易感染性を示すことが知られている。

本研究により、RipAY は、青枯病菌感染時において宿主植物細胞内に III 型分泌装置依存的に注入され、宿主細胞内で宿主由来 Trx (特に Trx h5) により活性化し、宿主 GSH を分解することで宿主免疫応答を阻害する新規なエフェクターであることが明らかになった (図 1)。

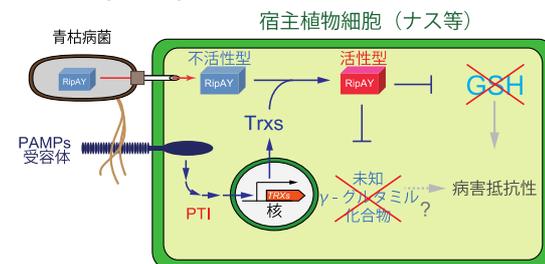


図1. 宿主植物 (ナスなど) は、青枯病菌感染時に病原菌特有のパターン (PAMPs) を認識する受容体により病原菌を感知し、PAMPs誘導性免疫 (PTI) を発現する。PTIは、病原菌に抵抗するための各種遺伝子 (チオレドキシシン, Trxを含む) の発現を誘導する。一方、青枯病菌は、宿主植物細胞内にIII型分泌装置を用いてエフェクターを注入することでPTIを抑制を試みる。エフェクターの一つ、RipAYは、不活性型として宿主細胞中に注入され、宿主Trx依存的に活性化することで宿主グルタチオン(GSH)を枯渇させ、病害抵抗性反応を阻害する。RipAYは、酵母ではGSH以外の未知γ-グルタミル化合物を分解することが示唆されたことより、植物においても同様の未知物質を分解することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. S. Fujiwara, T. Kawazoe, K. Ohnishi, T. Kitagawa, C. Popa, M. Valls, S. Genin, K. Nakamura, Y. Kuramitsu, N. Tanaka and M. Tabuchi (2016) RipAY, a plant pathogen effector protein, exhibits robust γ -glutamyl cyclotransferase activity when stimulated by eukaryotic thioredoxins. *J. Biol. Chem.*, **291** (13), 6813-6830.

〔学会発表〕(計7件)

1. 藤原祥子, 長谷川純一, 田中直孝, 田淵光昭. 「宿主グルタチオンを分解する植物病原菌エフェクターの機能解析」, 日本農芸化学会中四国支部第39回講演会, 2014年5月31日, 福山大学宮地記念館, 広島県, 福山市
2. 藤原祥子, 長谷川純一, 田中直孝, 大西浩平, 田淵光昭. 「酵母発現系を用いた宿主グルタチオンを分解する

病原菌フェクターの機能解析」, 酵母遺伝学フォーラム 第 47 回研究報告会, 2014 年 9 月 1-3 日, 東京大学弥生講堂, 東京都, 文京区

3. 藤原祥子, 川添智貴, 長谷川純一, 田中直孝, 大西浩平, 田淵光昭. 「宿主内因子によりグルタチオン分解活性を獲得する病原菌エフェクターの酵母システムによる解析」, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 28 日, 岡山大学, 岡山県, 岡山市
4. 藤原祥子, 川添智貴, 田中直孝, 田淵光昭. 「病原菌の”ズル賢さ”を酵母で解く: グルタチオンを分解するエフェクターの発見」, 酵母遺伝学フォーラム 第 47 回研究報告会, 2015 年 9 月 2 日, 広島大学, 広島県, 東広島市
5. 藤原祥子, 大西浩平, 川添智貴, 田中直孝, 田淵光昭. 「宿主グルタチオンを分解する植物病原菌エフェクター RipAY は宿主チオレドキシンにより活性化する」, 日本農芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会, 2015 年 9 月 18 日, 愛媛大学, 愛媛県, 松山市
6. 田淵光昭 「病原菌の“狡猾さ”を酵母で解く: グルタチオンを分解するエフェクターの発見とその機能解析」, 酵母研究会第 80 回講演会 第 3 回 NBRP 酵母シンポジウム合同講演会, 2015 年 9 月 28 日, 奈良女子大学, 奈良県, 奈良市
7. 藤原祥子, 川添智貴, 長谷川純一, 田中直孝, 大西浩平, 田淵光昭. 「植物病原菌エフェクター RSp1022 は宿主チオレドキシンを利用してグルタチオン分解活性を獲得する」, 第 33 回 YEAST WORKSHOP, 2015 年 11 月 14 日, せとうち児島ホテル, 岡山県, 倉敷市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 特許
発明者: 田淵 光昭
権利者: 香川大学
種類: 技術

番号: 2014-221474
出願年月日: 2014 年 10 月 30 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/mtabuchi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 光昭 (MITSUAKI TABUCHI)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号: 00294637

(2) 研究分担者

田中 直孝 (NAOTAKA TANAKA)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号: 60324109