

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34204

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892028

研究課題名(和文) イネ褐条病細菌由来の宿主特異性決定エフェクターの分子認識と免疫反応誘導機構の解明

研究課題名(英文) Study of induction mechanism of immune response by plant pathogenic bacterial effector

研究代表者

近藤 真千子 (KONDO, MACHIKO)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助手

研究者番号：40645975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原細菌の宿主特異性決定機構を明らかにすることを目的として、植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株の TAD1 分子の認識と免疫誘導機構について研究を行った。研究の結果、細胞外へ分泌された TAD1 が TIP と名付けたタンパク質と相互作用し、イネの免疫反応を誘導している可能性が示唆された。さらに、TAD1 が誘導する免疫反応のひとつであるイネの過敏細胞死には過敏細胞死の正の制御因子である OsNAC4 の発現誘導が伴うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：I studied the induction mechanism of plant immune responses that induced by pathogenic bacterial effector. I showed that TAD1 effector of *Acidovorax avenae* N1141 strain is secreted to extracellular and is interacted with rice protein named TIP. Furthermore, I found that hypersensitive (HR) cell death induced by TAD1 is accompanied with the expression of OsNAC4 as a key positive regulator of HR cell death.

研究分野：農芸化学、植物病理学

キーワード：植物病原細菌 エフェクター 植物 免疫 細菌 TypeIII分泌

## 1. 研究開始当初の背景

特定の植物病原細菌が感染できる植物種は限定されている。これは植物が侵入してきた細菌を認識し、免疫反応を誘導するためである。植物の免疫システムは鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンなどの PAMPs を認識して早期に誘導される活性酸素の発生などの PTI (PAMP-triggered immunity) と呼ばれる免疫反応と細菌が Type III 分泌装置を介して植物細胞内に分泌するエフェクターを植物が認識することによって誘導される ETI (Effector-triggered immunity) の 2 段階で誘導されることが知られている。特に ETI 免疫反応は過敏感細胞死などを含む強力な免疫反応であり、感染の成立・不成立を左右する重要な反応である。

研究対象である単子葉植物を宿主とする褐条病細菌 *Acidovorax avenae* は菌株間の宿主特異性が非常に厳密である。例えば、ヒエに対して病原性の N1141 菌株はヒエを病気にするが、この菌株をイネに接種すると免疫反応が誘導されるため感染は成立しない。

これまでの研究で、N1141 菌株を非宿主であるイネやタバコに接種すると ETI 免疫反応のひとつである過敏感細胞死が誘導されることを明らかにした。また、この過敏感細胞死が N1141 菌株の Type III 分泌装置欠損株では誘導されないことから、Type III 分泌装置を介して植物細胞内へ分泌されるエフェクターがこのような免疫反応誘導に関与していることを明らかにした。さらに、N1141 菌株のトランスポゾン変異株の大規模スクリーニング法や Type III 分泌装置欠損株を用いたプロテオーム解析を行い、イネの過敏感細胞死誘導に関与する TAD1 エフェクターを同定した。興味深いことに *tad1* 遺伝子欠損株はイネだけでなくタバコにおいても過敏感細胞死誘導能を失っており、一方で、宿主であるヒエに対する病徴発現能も失っていたことから、TAD1 エフェクターが N1141 菌株の宿主特異性を決定していることが示唆された。

しかし、非宿主であるイネやタバコにおける細菌の認識機構や免疫反応誘導機構については明らかになっておらず、この植物病原細菌の宿主特異性決定機構を理解するためには、この TAD1 エフェクターの認識と免疫反応誘導機構を分子レベルで詳細に明らかにすることが必要であった。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で *A. avenae* N1141 菌株の過敏感細胞死誘導に関与する TAD1 エフェクターを同定し、植物種間における宿主特異性を決定していることが示唆された。そこで、本研究では N1141 菌株の宿主特異性決定機構を明らかにすることを目的として、植物における TAD1 分子の認識機構と免疫反応誘導機

構について研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) TAD1 エフェクターの細胞内輸送機構

TAD1 の植物細胞内への輸送について CyaA 法を用いて解析を行った。この方法では、菌体内で発現させたエフェクターと CyaA (アデニル酸シクラーゼ) との融合タンパク質が植物細胞内へ輸送され、植物細胞内のカルモジュリンにより活性化して ATP を cAMP へ変換するため、cAMP 量を測定することでエフェクターの細胞内への輸送を確認することができる。この方法を用いた cAMP EIA により、野生株または Type III 分泌装置欠損株に TAD1 の CyaA 融合タンパク質を発現させた菌株を接種したイネ培養細胞における cAMP 量を測定した。

### (2) TAD1 の認識機構

TAD1 の相互作用因子について、イネの cDNA ライブラリーをプレイとした酵母 two-hybrid 法による相互作用分子のスクリーニングを行い、TAD1 の相互作用因子を明らかにした。

### (3) TAD1 認識による免疫反応誘導機構

TAD1 によって誘導される過敏感細胞死にイネの過敏感細胞死の正の制御因子であるイネ転写因子 OsNAC4 が関与するかどうかを *tad1* 遺伝子欠損株や TAD1 を発現させたイネプロトプラストを用いて調べた。

## 4. 研究成果

### (1) TAD1 エフェクターの細胞内輸送機構

TAD1 の植物細胞内への輸送について調べるために、野生株と Type III 分泌装置欠損株に TAD1 の CyaA 融合タンパク質を発現させた菌株をそれぞれ作製し、イネ培養細胞へ接種した。接種 9 時間後のイネ細胞内の cAMP 量を cAMP EIA によって測定した。その結果、TAD1 はイネ細胞内へ分泌されていないことが明らかとなった。そこで、Hrp 誘導培地上清への TAD1 の分泌を確認したところ、TAD1 が Hrp 誘導培地上清へ分泌されていることが明らかとなった。このことから、イネによる TAD1 の認識がイネ細胞内ではなくイネ細胞外で行われ、免疫反応が誘導されているという新たな可能性が得られた。

### (2) TAD1 の認識機構

植物における TAD1 の相互作用因子を明らかにするため、イネの cDNA ライブラリーをプレイとした酵母 two-hybrid 法による相互

作用分子のスクリーニングを行った。その結果、50 個の TAD1 と相互作用するタンパク質をコードする候補遺伝子を同定した。次に、そのうち特に相互作用が強く見られた 11 種類の遺伝子全長について、TAD1 との相互作用を確認したところ、約 700 アミノ酸から成る TIP と名付けたタンパク質とのみ相互作用が認められた。この TIP の細胞内局在予測を行ったところ細胞質に局在することが明らかとなったことから、TAD1 は TypeIII 分泌装置から細胞外へ分泌されたのち、イネ細胞内に取り込まれ、TIP と相互作用している可能性が示唆された。

### (3) TAD1 認識による免疫反応誘導機構

TAD1 によって誘導される免疫反応についてさらに詳しく解析を行うため、過敏細胞死誘導時に発現誘導されるイネの転写因子 OsNAC4 が TAD1 によって誘導される過敏細胞死に参与するかどうかをリアルタイム RT-PCR を用いて調べた。その結果、*tad1* 遺伝子欠損株を接種したイネ培養細胞では OsNAC4 の発現誘導が認められなかった。また、TAD1 を発現させたイネプロトプラストで OsNAC4 の発現誘導が認められたことから、TAD1 は OsNAC4 の発現誘導を介して過敏細胞死を誘導している可能性が示された。

### 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 1 件)

- (1) Hirai H, Takai R, Kondo M, Furukawa T, Hishiki T, Takayama S, Che FS. Glycan moiety of flagellin in *Acidovorax avenae* K1 prevents the recognition by rice that causes the induction of immune responses. (2014) Plant Signal Behav. 9(11):e972782 1-3 査読有

[学会発表](計 7 件)

- (1) 近藤 真千子, 仲 恭輔, 古川 岳人, 石野 早紀, 平子 暁, 蔡 晃植  
植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株の全ゲノム配列の決定とゲノム情報を用いた植物免疫反応を誘導するエフェクターの同定  
第 36 回日本分子生物学会年会  
2013 年 12 月 03 日-2013 年 12 月 06 日、兵庫。
- (2) 柳生 暁輝, 近藤 真千子, 宮田 千加, 蔡 晃植  
植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 菌株に存在するイネの過敏細胞死を誘

導するエフェクタータンパク質 IPPT の同定と機能解析  
第 36 回日本分子生物学会年会  
2013 年 12 月 03 日-2013 年 12 月 06 日、兵庫。

- (3) 柳生 暁輝, 近藤 真千子, 宮田 千加, 蔡 晃植  
イネの免疫反応を誘導するエフェクタータンパク質 IPPT の同定と機能解析  
日本農芸化学会 2014 年度大会  
2014 年 3 月 28 日-2014 年 03 月 30 日、神奈川。

- (4) 宮田 千加, 柳生 暁輝, 佐々木 悠, 川口 雄正, 近藤 真千子, 蔡 晃植  
植物病原細菌 *Acidovorax avenae* N1141 の *tad1* 変異株において認められるイネ過敏細胞死誘導能欠損の作用機序  
第 55 回日本植物生理学会年会  
2014 年 3 月 18 日-2014 年 03 月 20 日、富山。

- (5) Machiko Kondo, Kyosuke Naka, Saki Ishino, Satoru Hirako and Fang-Sik Che  
Identification of novel effector proteins that induce plant immune responses by whole genome sequencing of plant pathogenic bacteria *Acidovorax avenae* N1141 strain  
XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions  
2014 年 07 月 06 日-2014 年 07 月 10 日、ギリシャ。

- (6) 近藤 真千子, 仲 恭輔, 古川 岳人, 石野 早紀, 平子 暁, 蔡 晃植  
植物病原細菌 *Acidovorax avenae* のゲノム情報を用いた植物免疫反応を誘導するエフェクターの同定とその機能解析  
第 37 回日本分子生物学会  
2014 年 11 月 25 日-2014 年 11 月 27 日、神奈川。

- (7) 鈴木 愛芽, 柳生 暁輝, 川口 雄正, 近藤 真千子, 蔡 晃植  
イネの過敏細胞死を誘導する新規エフェクタータンパク質 IPPT の同定  
第 56 回日本植物生理学会年会  
2015 年 03 月 16 日-2015 年 03 月 18 日、東京。

[図書](計 1 件)

- (1) 高畑 京也, 近藤 真千子 含む他 159 名  
技術情報協会  
再生医療における臨床研究と製品開発  
2013 年,  
577 ページ

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

近藤 真千子 (KONDO MACHIKO)  
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
助手  
研究者番号：40645975