

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07676

研究課題名(和文) 宿主植物のアクチン骨格形成の阻害によるキサントモナス属細菌の感染機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the infection mechanism of Xanthomonas pathogen by inhibition of actin cytoskeleton of plant host

研究代表者

秋本 千春 (Akimoto-Tomiya, Chiharu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：50414876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネ白葉枯病の原因細菌であるイネ白葉枯病菌はタイプ III 分泌装置を通して宿主であるイネの細胞内部にXopRというタンパク質を注入することで、イネの基礎免疫を抑制し、感染に成功する。本課題では、XopRがどのようにイネの基礎免疫を抑制しているかを明らかにした。XopRが標的とする宿主の遺伝子を欠損した植物を作成し、XopRを注入したときと同じ反応をすることを確かめた。また、その際宿主植物のアクチン骨格の正常な形成及び気孔の正常な開閉が阻害されていた。以上から、XopRによる宿主植物の気孔を介した基礎免疫の阻害が初めて明らかとなった。宿主の標的遺伝子の阻害の抑制が、イネ白葉枯病の予防に有効である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

XopRのようなタイプ III エフェクターが宿主の植物内でどのように働いているかが明らかになることで、イネ白葉枯病という温暖化の進展によって発生地が拡大が続いている細菌性の病害に対して有効な薬剤を迅速に開発するために必要な標的遺伝子の特定(社会的意義)につながり、また植物の新しい免疫機構が明らかになる(学術的意義)ことで、植物側の免疫を向上させ多くの病害を防除する新規手法の開発(社会的意義)につながる。

研究成果の概要(英文)：<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (Xoo) is the causal agent of bacterial blight of rice. The XopR protein, secreted into plant cells through the type III secretion apparatus, inhibited basal defense responses in plants rapidly after MAMP recognition. In this study, we studied the way how XopR inhibited the basal defense. First we identified target gene in the host and confirmed using mutant plant which had insertion in the gene. Furthermore both actin cytoskeleton and stomatal movement were inhibited in the mutant. It was concluded that XopR inhibited stomatal defense through the target gene. These results strongly suggested that suppression of inhibition of the target gene by XopR might be effective for protection from bacterial blight.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ白葉枯病 アブラナ科植物黒腐病 タイプ III エフェクター アクチン骨格

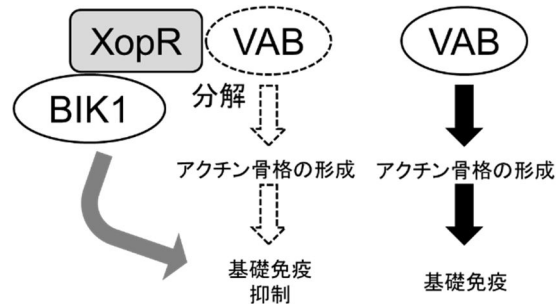
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は微生物の構成成分 (MAMPs) を植物細胞膜上にある MAMPs 受容体で認識し、一連の基礎免疫を發揮して⁽⁴⁾微生物の侵入を阻止する。この基礎免疫応答によって多くの微生物は植物に感染することができない。一方、植物病原細菌は、植物宿主の認識直後にタイプ Ⅲ 分泌装置とよばれる針状の装置を植物表層から細胞質内に穿刺し、タイプ Ⅲ エフェクターとよばれる数十種類のタンパク質を細胞質内に注入する。このタイプ Ⅲ 分泌装置の欠損株は病原性を完全に失う⁽⁵⁾ことから、エフェクターは病原菌の病原性の發揮のため必要不可欠な因子である。このエフェクターを介した植物 - 微生物間の相互作用は、現在世界で最も精力的に研究されているテーマの一つであり、エフェクターが宿主の MAMPs 受容体、シグナル伝達系、ホルモン分泌系等を多種多様に攻撃していることが明らかになってきている⁽⁶⁾。

平成 24 年に、イネ、野菜、果樹など 100 種以上の作物に病気を起こし、農業上最も防除が求められる細菌のひとつであるキサントモナス属細菌の分泌するタイプ Ⅲ エフェクターである XopR が基礎免疫を抑制することで、病原菌の病原性獲得に寄与していることを報告した⁽¹⁾。しかし、XopR は既知の他のエフェクターのアミノ酸配列に相同性がなく、一次構造からは作用機構の予測が困難である。XopR の宿主内での働きを明らかにするため、宿主内ターゲットの解析を進め、これまでに XopR がモノユビキチン化され植物の細胞内膜に局在しプロテアソーム依存的に分解されること、さらに、宿主の液胞型 ATPase サブユニット (VAB) と結合すること、XopR 発現植物の生育が著しく抑制されること (未発表) を明らかにしている。VAB はプロトンポンプとして液胞内の pH を正常に保つ働きを有すると同時に、*in vitro* ではアクチンと結合し、アクチン骨格の形成に関与すること^{(2) (3)}が報告されている。アクチンは細胞骨格を形成する重要なタンパク質であり、基礎免疫応答にもアクチン骨格の形成が必要⁽⁷⁾との報告がある。これらの実験結果から XopR が宿主植物内で VAB と結合し、その分解もしくは機能抑制によってアクチン骨格の形成を阻害し、その結果免疫応答を抑制しているという仮説 (右図) を立てた。事実、予備の実験では、XopR 発現植物のアクチン骨格形成が著しく抑制されることが観察されている。

また、XopR は MAMPs 受容体の細胞質キナーゼファミリーに属する BIK1 と結合することが報告されている⁽⁸⁾。XopR が BIK1 の機能を阻害するかは不明であるが、BIK1 欠損株ではアクチン骨格の形成の抑制がみられないことから⁽⁷⁾、XopR と BIK1 の相互作用は、VAB との相互作用とは異なった機能があると推測できる。



(1) Akimoto-Tomiya et al. (2012) Mol Plant Microbe Interact. 25:505-514. (2) Ma et al. (2012) J Biol Chem. 287(23):19008-17. (3) Serra-Peinado et al. (2016) J Biol Chem. 291(14):7286-7299. (4) Boller and Felix (2009) Annu. Rev. Plant Biol. 60:379-406. (5) Lindeberg and Collmer (2009) Trends in Microbiology 17:304-311. (6) Khan et al. (2016) Curr Opin Microbiol. 29:49-55. (7) Henty-Ridilla et al. (2013) Plos Pathogens 9:e1003290. (8) Wang et al. (2016) Sci China Life Sci. 59(9):897-905. (9) Singer et al. (2013) Plos Pathog. 9(1):e1003121. (10) Gimenez-Ibanez et al. (2009) Curr Biol. 10;19(5):423-429. (11) Cheng et al. (2012) Curr Opin Plant Biol. 15(4):392-399.

2. 研究の目的

本研究は、広宿主域の植物病原性キサントモナス属細菌が持つ病原性因子 XopR の作用機構を、宿主の液胞型 ATPase サブユニット (VAB) の分解とそれによる宿主のアクチン骨格形成阻害に着目して解明することを目的とする。

3. 研究の方法

仮説を検証し、XopR の宿主内での機能を総合的に理解するため、以下の 5 点を明らかにする。

課題 1. XopR と結合した VAB はプロテアソーム依存的に分解されるか

課題 2. XopR は宿主のアクチン骨格の形成を阻害するか

課題 3. VAB は植物の基礎免疫応答に必要なか

課題 4. VAB と BIK1 は独立して機能しているか

課題 5. XopR による VAB もしくは BIK1 の分解 (もしくは機能改変) がアクチン骨格の形成を阻害するか

4. 研究成果

課題1. XopR と結合した VAB はプロテアソーム依存的に分解されるか

1-1. XopR 存在下での VAB の *in vivo* での挙動の解析
・ベンサミアーナの一過性発現系による共発現タンパク解析

C 末端に蛍光タンパク質を結合させた VAB と C 末端に His タグを結合させた XopR をアグロバクテリアを用いた一過性発現系にてベンサミアーナに共発現させ、経時的にサンプリングし、ウエスタンブロットを行い GFP 抗体、His 抗体、XopR 抗体での検出を試みた。しかしながら、VAB 単独で発現させた場合において、GFP 抗体での検出ができず、共焦点顕微鏡においても強い蛍光が確認できなかった。そこで、His タグを結合させた VAB の発現を試みたところ、XopR は予想サイズよりも 10kDa 程度大きい場所にバンドが確認された。His 抗体で VAB の予想サイズ付近にバンドが検出された。両者を同時に発現させると、プロテアソーム阻害剤の添加によって XopR::GFP のバンドは濃くなった一方、VAB::His のバンドは消失した(図1)。さらに、His 抗体によって 240kDa 付近にバンドが確認された。これは、VAB::His が XopR は含まない何らかの集合体を作っていると考えられた。この集合体はプロテアソームではないかと推測される。続いて、XopR を DEX で誘導発現するシロイヌナズナの組換え体での VAB の挙動を観察するために、VAB に対するペプチド抗体を新たに作製して intact の植物における VAB の挙動を観察を試みた。様々な条件での検出を試みたが、作製した VAB 抗体では植物中の VAB を検出することができなかった。また、この抗体は前述のタグ抗体で検出された VAB も検出できなかったことから、何らかの影響でこの VAB 抗体が働いていないか、もしくはタグ抗体で検出されたバンドも交差した他のタンパクを検出した可能性も排除できない。VAB タンパク質の植物内での挙動については確かな結果を得ることができなかった。

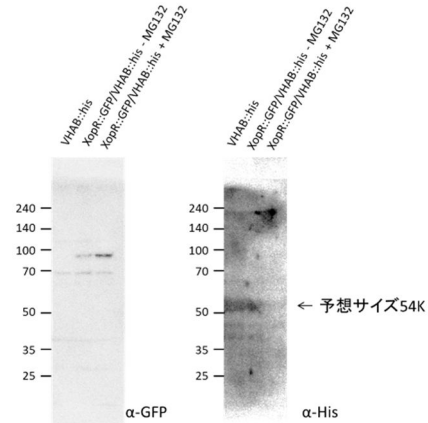


図1 ベンサミアーナを用いた共発現

1-2. XopR 存在下での VAB の *in vitro* での挙動の解析

大腸菌発現系及び脱液胞化タバコ細胞を用いた試験管内翻訳系を用いて XopR を発現させたところ、大腸菌では予想サイズと同程度であったが、試験管内翻訳系においてはアグロバクテリアを用いた一過性発現系と同様の大きさであった。このことから、XopR は植物内でユビキチン等の修飾を受けている可能性が考えられた。そのため、*in vitro* で発現させた XopR では植物内での実際の挙動を再現させるのが困難であると判断した。

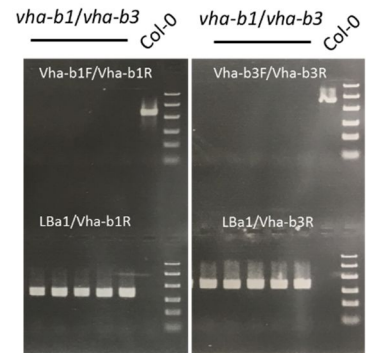


図2. PCRによるT-DNA挿入の確認

1-3. V-ATPases 活性の変化

以上のように VAB たんぱく質の植物における検出ができなかったことから、ウエスタンブロットではなく酵素活性を指標に VAB の挙動を解析することとした。シロイヌナズナの VAB は Vha-b1、Vha-b2、Vha-b3 の 3 つのアイソログをもつ。シロイヌナズナの VAB 遺伝子への T-DNA 挿入変異株ホモライン (*vha-b3*: SALK_083133C、SALK_152317C、SALK_013508C) 及びヘテロライン (*vha-b1*: SALK_110791、SALK_028728) を ABRC より入手した。Vha-b1 は T-DNA の挿入のあるホモ個体を得られた。Vha-b1 及び Vha-b3 のホモ個体は顕著な表現型が得られなかったことから、両者の 2 重変異体の作出を試みた。当初はなかなか T 3 世代が得られなかったが、栽培の光条件を変化させたところ 2 重変異体の作出に成功した(図2)。この 2 重変異体は 8 時間明期の栽培条件においては野生株と比較して矮小化が観察されたが、16 時間明期では野生株と同様の生育を示した(図3)。このことから、VAB はシロイヌナズナの幼苗の生育に必須であることが示唆された。XopR 発現植物も 8 時間明期の栽培条件では矮小化すること、また、XopR 発現植物も誘導発現系のみが形質転換系統を得られたことなど、XopR 発現植物と VAB 欠損植物は同様の表現型を示していることは興味深い。

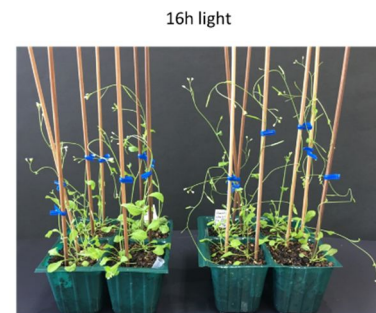
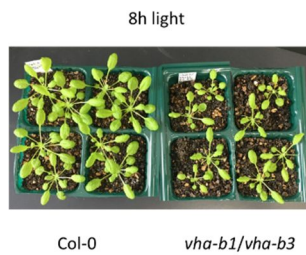


図3. 播種後5週間の植物。
*vha-b1/vha-b3*は短日条件下(8時間明期)で矮小化するが、長日条件(16時間明期)下では通常の生育を示す

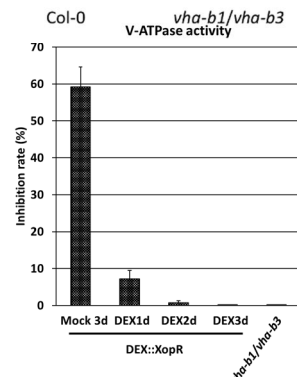


図4 XopR発現植物におけるV-ATPase活性

XopR 発現植物における V-ATPases 活性を測定したところ、DEX 処理で XopR を発現させた植物では DEX 処理後 1 日で V-ATPases 活性が強く阻害されていること

が明らかとなった(図4)。vha-b1/vha-b3 二重変異体においても同酵素の活性は強く阻害されていたことから、Vha-b1 及び Vha-b3 がシロイヌナズナにおける V-ATPases の活性に必要であることが明らかとなった。以上から、VAB は XopR 存在下でその酵素活性を失うことが明らかとなった。

現在、XopR 発現植物にプロテアソーム阻害剤を作用させた場合の V-ATPases 活性を測定し、VAB がプロテアソーム依存的に分解されるか測定しているところ。

課題2. XopR は宿主のアクチン骨格の形成を阻害するか

GFP で標識したアクチンを恒常的に発現するシロイヌナズナ (actin:GFP) に XopR を誘導発現させたところ、XopR 発現植物ではアクチン骨格が非誘導植物と比較して変化していた(図5、6)。Density 及び Skewness はいずれもアクチン骨格の密度と太さの指標として広く用いられている。また、actin:GFP シロイヌナズナに V-ATPases 阻害剤を作用させたところ、XopR 発現植物と同様に、アクチン骨格のかく乱が生じていた(図6)。このことから、V-ATPases の阻害がアクチン骨格のかく乱をもたらすことが初めて明らかとなった。以上から、XopR は VAB の活性を低下させるとともに、シロイヌナズナのアクチン骨格の正常な形成を阻害することが明らかとなった。

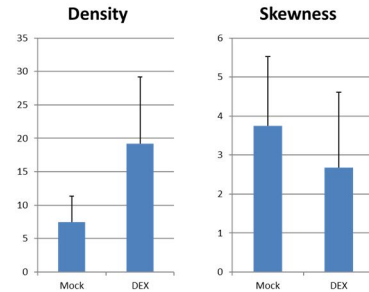


図5 XopRの発現(DEX処理)はシロイヌナズナのアクチン骨格形成に影響を与えた

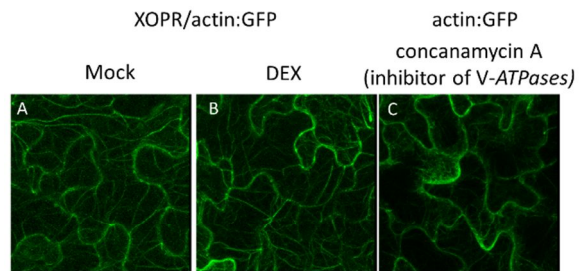


図6 (A, B) XopR発現組換え植物におけるアクチン骨格を共焦点顕微鏡で可視化。(A)XopR非発現植物、(B) XopR発現植物 (C) V-ATPases阻害剤処理の場合のアクチン骨格

課題3. VAB は植物の基礎免疫応答に必要なか

VAB が基礎免疫応答に与える影響を解明するため、VAB の二重変異体 (vha-b1/vha-b3) に MAMPs (フラジェリン flg22) を処理し活性酸素の生成を測定した。その結果、XopR 発現植物と同様に flg22 による活性酸素の生成が抑えられた。このことから、VAB は flg22 による基礎免疫を抑制していると考えられた。

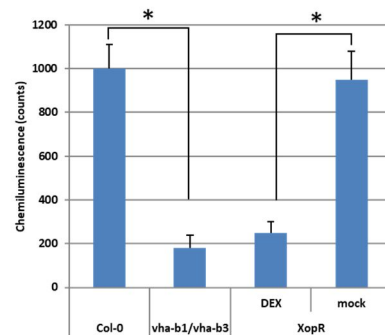


図7 VABはFlg22による活性酸素生成に必要なである

課題4. VAB と BIK1 は独立して機能しているか

XopR と BIK1 の相互作用については、プロトプラストを用いた *in vitro* の免疫沈降法にて確認されたと報告された。そこで、酵母のツーハイブリッドシステムを用いて、両者の結合を試験したところ、報告者の実験条件下では結合が確認できなかった。また、bik1 変異植物として実験に使用された組換え植物を入手したが、BIK1 の変異は確認されなかった。このような状況で BIK1 についての検討を進めることはできないと判断し、Bik1 と XopR の相関についての検討は行わないこととした。

当初想定していなかった進展

アクチンに GFP をタグした植物では、孔辺細胞もアクチンが張り巡らされているため、GFP の蛍光を観察することができる。また、VAB の二重変異体においては短日条件下で矮化した。そこで、アクチンに GFP をタグした XopR 発現植物を用いて、昼間と夜間の気孔を観察し、気孔の縦横のサイズを測定した。その結

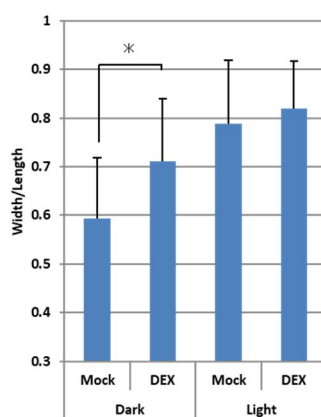


図8 XopR発現植物では夜間でも気孔が開いている

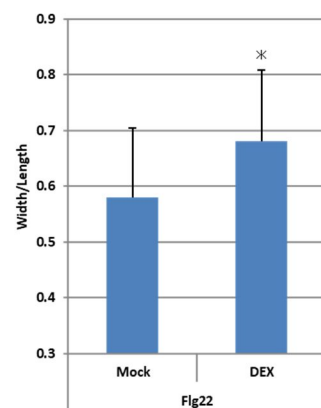


図9 XopRはflg22による気孔の閉鎖を阻害する

果、昼間は XopR の発現の有無に関係なく気孔があいていた。一方、夜間は通常は閉鎖する気孔が、XopR 発現植物では開いたままであった(図8)。このことから、光合成の行われない夜間でも水分の蒸散が生じ、生育が抑制されるのではないかと考えられた。気孔の閉鎖は、flg22 処理によって引き起こされる基礎的抵抗反応のひとつである。そこで、flg22 処理における気孔の様子を観察した結果、XopR 発現植物においては気孔の閉鎖が阻害された(図9)。このことから、XopR は光応答による気孔の開閉を阻害するばかりではなく、PAMPs による気孔の開閉をも阻害することが明らかとなった。では、この気孔の開閉の阻害に VAB はどのように関与しているのだろうか。XopR を発現しない植物に V-ATPase 阻害剤を処理し、気孔を観察したところ、flg22 による気孔の閉鎖が阻害されていた(図10)。このことから、XopR はアクチン骨格の形成に必須な V-ATPase の活性を阻害し、その結果 PAMPs による気孔の閉鎖や活性酸素の生成といった基礎的な免疫応答を阻害することが明らかとなった。

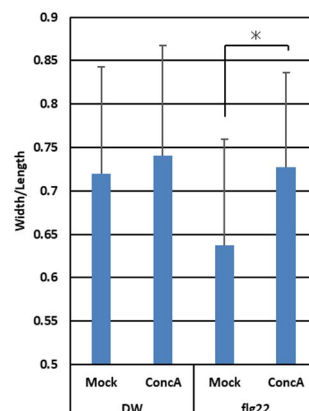


図10 ATPase阻害剤処理はflg22による気孔の閉鎖を阻害する

総括

VAB が XopR と結合してどのような挙動を示しているのか依然明らかになっていない。特に、ベンサミアンを使用した一過性発現系においても実際の植物体においても VAB の発現量が低く、その挙動を明確にとらえることができなかった。一方、プロテアソーム阻害剤処理において、プロテアソームと似た分子量の高分子のタンパクが検出されていることから、VAB がプロテアソーム依存的に分解されている可能性は示唆される。実際、XopR 発現植物においては V-ATPase 活性が低下していた。現在検討中の、プロテアソーム阻害剤を処理した場合の V-ATPase 活性測定において、V-ATPase 活性が低下していなかった場合は、この可能性が高い。アクチン骨格の形成の観察のために作成した組換え植物の観察を通じて、気孔の開閉が XopR によって阻害されていることが明らかとなった。これは当初予定しなかった結果で、V-ATPase が気孔の開閉に必要なものであるという新たな知見を得ることができた。また、植物の基礎免疫応答の一つである気孔の開閉にはアクチン骨格の形成が必要であることも明らかとなった。これらはこれまで明らかになっていない新しい発見で、今後は V-ATPase が病害抵抗性の一つの指標となる。XopR による V-ATPase の抑制は、気孔の開閉の抑制という病害抵抗性のみならず植物の生存そのものをおびやかす根源的な病原細菌にとっての戦略であるという点で興味深い。

イネ白葉枯病はイネ白葉枯病菌が導管内で増殖し、導管の閉塞による病害である。これまで得られた結果はシロイヌナズナを用いているが、XopR がイネでも同様の働きをすると仮定した場合、導管内で増殖した病原細菌が宿主であるイネに注入する XopR により V-ATPase 活性が阻害されると同時にアクチン骨格の形成が阻害されると推測される。XopR は基礎免疫応答のひとつである気孔の閉鎖の阻害をもたらすだけでなく、アクチン骨格の形成不全が関与する様々な不具合、例えば光照射下でのクロロプラストの移動の阻害など、より多くの複合的なダメージをイネに与えると推測される。したがって、この病気の防除に当たっては、植物の健全な生育と基礎免疫応答の維持のために V-ATPase 活性およびアクチン骨格の形成を維持することが求められる。仮に、XopR 発現植物へのプロテアソーム阻害剤の処理によって V-ATPase 活性が維持できた場合、アクチン骨格の形成も正常であるのか、また、病原細菌の増殖が維持されているのか等を検討することによって、プロテアソーム阻害剤がイネ白葉枯病菌の防除剤として使用できる可能性がある。一方、プロテアソーム阻害剤によって不必要なたんぱく質の蓄積といった副作用やそのコストを考慮する必要もある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉川 学 (Yoshikawa Manabu) (80391564)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	