

## 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 5月28日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780043

研究課題名（和文）タイプⅢ分泌エフェクターXopRを介したイネ白葉枯病菌の植物感染機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the infection mechanism of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* through a type III secretion effector XopR

研究代表者

古谷 綾子 (FURUTANI Ayako)

茨城大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号：30570270

研究成果の概要（和文）：

白葉枯病菌において、タイプⅢ分泌エフェクターXopRが宿主イネへの病原性に関与し、タバコ耐病性への関与が報告されているイネOsBIPP2C1と相互作用するとの予備的知見を得ていた。本研究では、植物細胞内における両タンパク質の相互作用について明らかにすることはできなかったが、XopRがイネの抵抗性抑制に関与することが示唆された。また、OsBIPP2C1がアルカリフォスファターゼ2Cとしての酵素活性を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We had a preliminary data which shows that a type III secretion effector, XopR, of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is involved in pathogenicity on host rice and interacts with OsBIPP2C1 whose involvement in tobacco disease resistant had been reported. In this study, we could not clarify the interaction between the two proteins. However, it was suggested that XopR is responsible for the suppression of rice disease resistance. Also, we showed that OsBIPP2C has an enzymatic activity as a alkaline protein phosphatase 2C.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用、タイプⅢ分泌エフェクター

## 1. 研究開始当初の背景

多くのグラム陰性植物病原細菌では、その感染過程において、hrp遺伝子群にコードされるタイプⅢ分泌系が重要な役割を果たす。病原細菌は、タイプⅢ分泌装置を介して、

複数のエフェクタータンパク質を植物細胞内に直接注入する。エフェクター分泌能を欠損したタイプⅢ分泌変異株は病原性を欠くことから、感染過程におけるエフェクターの重要性は明らかである。このことから、病原

細菌のタイプⅢ分泌系を介した植物感染機構を理解する上で、エフェクターの機能解析は必要不可欠である。近年、各種微生物で急速にゲノム解析が進み、多くのエフェクターが同定され、いくつかの病原細菌では数十にも及ぶエフェクターをもつことが明らかにされている。最近の研究動向は、国内外を含め、エフェクターの同定からその機能解明へと研究の方向性がシフトしつつある。変異株を用いた解析から、多くのエフェクターでその病原性への関与について検討されているが、タイプⅢ分泌装置の重要性にも関わらず、個々のエフェクターを欠損させても病原性にほとんど影響を及ぼさないことが明らかにされている。一方で、複数のエフェクターを欠損させると病原性の低下が顕著になることが報告されており、その機能の重複性も示唆されている。エフェクターの機能解析は、*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*において最も精力的に研究が進められている。その研究成果から、エフェクターは感染初期における宿主防御応答、特に、鞭毛タンパク質フラジェリンやリポ多糖、キチン等の微生物由来の分子パターン (microbe-associated molecular patterns; MAMPs) によって引き起こされる自然免疫を抑制することで細菌増殖を可能にし、宿主を発病させることが解明されつつある。すなわち、エフェクターは積極的な病原性の発現に寄与しているというよりは、植物の抵抗性発現の抑制において重要な役割をもつと考えられる。しかし、エフェクターの宿主細胞内における作用機作については多くが未解明である。

## 2. 研究の目的

研究対象としている白葉枯病菌においても、他の植物病原細菌と同様、タイプⅢ分泌系がその宿主イネへの感染成立に必須である。本菌においては、transcription activator-like (TAL) ファミリーのエフェクターに関して多くの知見が得られているが、それ以外のエフェクターに関する知見はほとんどなかった。しかしながら、白葉枯病菌のゲノム中にはTALファミリー以外にも複数のエフェクターが存在し、宿主への感染過程において重要な役割を担っていることが予想された。研究代表者は白葉枯病菌のゲノム配列情報を利用することにより、これまでに16種類のエフェクターを同定することに成功している。また、それぞれのエフェクター変異株の解析から、少なくとも2つのエフェクター (XopK と XopR) が病原性に関与することを確認している。研究代表者は、共同研究者らとともに、エフェクターの機能解明に向けて、同定したエフェクターの全てにつ

いて、それぞれを過剰発現する形質転換イネの作出、および、その宿主内ターゲット因子の探索を網羅的に進めている。病原性への関与を確認している XopR については、形質転換イネの作出に成功しており、また、酵母 Two-hybrid assay により、イネのプロテインホスファターゼ 2C 遺伝子 (*OsBIPP2C1*) の産物と相互作用することを示唆する知見を得ている。

本研究では、XopR が *OsBIPP2C1* の機能を阻害するかについて調べるとともに、白葉枯病菌の感染過程における XopR の役割、およびイネ耐病性における *OsBIPP2C1* の役割について解析することで病原細菌の感染戦略と植物の防御戦略の一端を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) *xopR* 遺伝子を導入した形質転換イネを利用したイネ防御応答の解析

デキサメタゾン (DEX) 誘導プロモーター制御下で *xopR* 遺伝子を発現する形質転換イネを用いて、XopR の植物防御応答抑制における機能について解析を行った。なお、形質転換イネについては、*xopR* 遺伝子が1コピーでホモに挿入された個体を T2 世代にて選抜しており、これを材料として用いた。

#### ① XopR 発現が植物体内での細菌増殖に及ぼす影響についての検討

形質転換イネを DEX 処理 (*xopR* 遺伝子発現誘導条件)、および、Mock 処理 (*xopR* 遺伝子発現非誘導条件) 後、白葉枯病菌を剪葉接種し、病徴観察およびイネ葉内での細菌増殖を調べた。

#### ② XopR 発現が植物の自然免疫に及ぼす影響についての検討

XopR 発現により植物の自然免疫が抑制されるかについて、細胞壁におけるカロースの蓄積を指標として検討を行った。自然免疫については、*xopR* 遺伝子を導入した形質転換イネおよび形質転換シロイヌナズナを DEX 処理、および、Mock 処理し、イネにはタイプⅢ分泌系を欠損した白葉枯病菌を、シロイヌナズナには鞭毛フラジェリンタンパク質を構成するペプチド f1g22 を各植物葉に注入接種後、アニリンブルー染色により接種部におけるカロースの蓄積を調べた。

#### ③ XopR 発現により影響を受けるイネ防御関連遺伝子の発現動態の解析

形質転換イネを DEX 処理、および、Mock 処理後、マイクロアレイ解析を行うことで、XopR 発現により影響を受けるイネ防御関連遺伝子の解析を行った。

(2) XopR と OsBIPP2C1 の相互作用についての解析

① XopR と OsBIPP2C1 の植物細胞内における相互作用の確認

*N. benthamiana*においてXopRとOsBIPP2C1の両タンパク質を共発現させるために、アグロバクテリウムを用いて*xopR::GFP*遺伝子、および*OsBIPP2C1::myc*遺伝子の一過性発現実験を行い、共免疫沈降法により両タンパク質の相互作用について検討した。

② XopR と OsBIPP2C1 の局在解析

アグロバクテリウムを介した一過性発現実験により、XopR と OsBIPP2C1 のそれぞれをCFP と YFP と融合させたタンパク質を、タバコ的一种であるモデル植物 *N. benthamiana* 葉で共発現させ、共焦点蛍光顕微鏡で観察し、それぞれのタンパク質の植物細胞内における局在について検討した。

(3) OsBIPP2C1 の機能解析

① OsBIPP2C1 を過剰発現およびノックダウンさせた形質転換イネの作出

恒常発現プロモーターおよびDEX誘導プロモーター制御下でOsBIPP2C1を高発現させた形質転換体、およびRNAi法によりOsBIPP2C1の発現を抑制させた形質転換体の作出を試みた。

② OsBIPP2C1 のホスファターゼ活性阻害におけるXopRの役割の解析

大腸菌において、pETシステムを利用し、C末端側に6xHisタグが付加されたOsBIPP2C1-His融合タンパク質を大量発現させ、His-Bind resinを用いたアフィニティー精製により本融合タンパク質を精製した。精製したタンパク質について、各種pH条件下においてp-nitrophenolを基質とした酵素活性測定を行い、アルカリフォスファターゼ活性を有するかを検討した。さらに、Serin/Threonine Phosphatase Assay System (Promega) を用いて精製した融合タンパク質の基質特異性について検討した。

4. 研究成果

(1) *xopR* 遺伝子を導入した形質転換イネを利用したイネ防御応答の解析

① XopR 発現が植物体内での細菌増殖に及ぼす影響についての検討

*xopR*遺伝子を導入し、その発現を誘導させた形質転換イネ葉に白葉枯病菌を接種したところ、*xopR*遺伝子の発現が誘導されていないイネ葉と比較して、病斑の進展が顕著となり、また、葉内での細菌増殖に促進がみられた。

② XopR 発現が植物の自然免疫に及ぼす影響に

についての検討

実験の技術的問題により、イネ葉においてはカロース蓄積を観察することができなかった。一方、Mock処理をした*xopR*遺伝子導入形質転換シロイヌナズナにおいては、カロースの蓄積が顕著に見られたのに対し、DEX処理により*xopR*遺伝子の発現を誘導した形質転換体においてはその蓄積に著しい抑制がみられた。このことから、XopR発現は植物の自然免疫抑制に関与することが示唆された。

③ XopR 発現により影響を受けるイネ防御関連遺伝子の発現動態の解析

XopR発現により影響を受けるイネ防御関連遺伝子の発現動態を調べたところ、既知防御関連遺伝子のPR-1遺伝子やペルオキシダーゼ遺伝子に加え、エチレン応答への関連が予想されるAtERF5と相同性を有する遺伝子やOsERF3遺伝子の発現が抑制されることが確認された。*xopR*遺伝子導入形質転換シロイヌナズナにおいて、シロイヌナズナのエチレン処理時に観察されるトリプルレスポンスを確認している。エチレンは植物の防御応答シグナル物質の1つとして知られる。これらのことから、白葉枯病菌タイプIIIエフェクターXopRはエチレンを介した植物の防御応答シグナルカスケードを攪乱することで自然免疫を抑制する可能性が示唆された。

(2) XopR と OsBIPP2C1 の相互作用についての解析

① XopR と OsBIPP2C1 の植物細胞内における相互作用の確認

XopR::GFPとOsBIPP2C1のPP2Cドメインを含むC末端領域にc-Mycタグを付加させたOsBIPP2C1 $\Delta$ N-Mycについては一過的発現実験によりタンパク質の発現を確認することができた。しかし、完全長のOsBIPP2C1-Mycについては極低レベルでしか発現がみられなかった。共免疫沈降法によりXopR::GFPとOsBIPP2C1-Mycとの相互作用について検討を行ったが、両タンパク質の相互作用については明らかにすることができなかった。

② XopR と OsBIPP2C1 の局在解析

XopRについては植物細胞内では細胞膜に局在することが明らかになった。一方、OsBIPP2C1については細胞膜とは異なる細胞内小器官に局在がみられ、両タンパク質の局在一致は確認できなかった。このため、植物体内における局在解析によってXopRとOsBIPP2C1の相互作用を明らかにすることは確認できなかった。しかし、第三のタンパク質がそれらの相互作用に関与する可能性も考えられることから、他の解析による検討も必要である。

### (3) OsBIPP2C1 の機能解析

#### ① 形質転換イネを用いた解析

OsBIPP2C1 をノックダウンさせた形質転換イネの作出を行った。しかし、期間中に得られた形質転換体を用いた解析を行うことはできなかった。一方、*OsBIPP2C1* 遺伝子導入イネについては、恒常発現プロモーターおよび薬剤誘導性プロモーターのそれぞれで本遺伝子を発現するような形質転換体の作出を試みた。しかし、いずれにおいても形質転換体を得ることができなかった。

#### ② OsBIPP2C1 の酵素活性についての解析

OsBIPP2C1 については、その構造類似性からセリン/スレオニン型のアルカリフォスターゼPP2Cをコードすると予想されていたが、実際に本酵素活性を有するかについては明らかでなかった。そこで、大腸菌内でOsBIPP2C1-Hisを大量発現させ、精製した融合タンパク質について酵素活性試験を行った。その結果、本融合タンパク質は塩基性条件下でホスファターゼ活性を示し、リン酸化スレオニンを含むペプチドを基質とし、その活性にはMg<sup>2+</sup>イオンが必要であることが確認され、OsBIPP2C1 がPP2Cファミリータンパク質であることが明らかとなった。そこで、同様に発現精製したXopRがOsBIPP2C1 のホスファターゼ活性を阻害することができるかを検討しようとしたが、可溶性のXopRを得ることができず、*in vitro*実験による酵素活性阻害能を確認することはできなかった。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 古谷綾子、秋本千春、落合弘和、津下誠治: *Xanthomonas*属植物病原細菌のタイプⅢ分泌エフェクターXopRの機能解析, 日本細菌学雑誌, 67(1): 57. 2012年3月27日.
- ② 秋本千春、古谷綾子、津下誠治、落合弘和: イネ白葉枯病菌タイプⅢエフェクターXopRはシロイヌナズナにおける基礎的抵抗性反応を抑制する, 日本植物病理学会報, 77(3): 98. 2011年3月29日.

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

古谷 綾子 (FURUTANI AYAKO)

茨城大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号: 30570270