

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658042

研究課題名(和文) 青枯病菌のタンパク質分解酵素エフェクターによる過敏感反応誘導と罹病化機構の解明

研究課題名(英文) Induction of Hypersensitive Response and Susceptibility by Protease Effector from *Ralstonia solanacearum*

研究代表者

一瀬 勇規 (Ichinose, Yuki)

岡山大学・その他の研究科・教授

研究者番号：50213004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ナス科植物青枯病菌が分泌する病原性因子エフェクターの中から、本菌の非宿主で台木ナスのトルバムビガーに細胞死を伴う激しい防御応答(HR)を誘導するRip36を同定した。Rip36はZnプロテアーゼモチーフを有するが、このモチーフに変異を導入するとHR誘導能を失ったことから、Rip36はトルバムビガーの標的タンパク質を分解することでHRを誘導したと考えられた。一方、rip36欠損変異株の宿主ナスにおける増殖能は野生株と変わらず、ナスに対する病原性に必須の因子ではないことが判明した。

研究成果の概要(英文)： *Ralstonia solanacearum* causes bacterial wilt disease in more than 200 plant species, including economically important Solanaceae species. *R. solanacearum* injects virulence factor proteins effectors into plant cytoplasm, then induces hypersensitive response (HR) in nonhost plants and disease in host plants. In this study we identified one effector Rip36 induces HR in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum* in an Hrp-dependent manner. Rip36-induced HR requires the putative Zn-protease motif. On the other hand, Rip36 is a dispensable virulence factor to cause disease in eggplant, because rip36-defective mutants grew well in host eggplants as the wild type.

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：非病原性因子 エフェクター 過敏感反応 病原性 Zn依存性プロテアーゼ 非宿主

1. 研究開始当初の背景

ナス科植物青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は多くのナス科植物に感染する難防除性の土壌病原細菌であり，防除法の確立と耐病性作物の育種が急務といえる。本菌の RS1000 株は非親和性のナス台木品種トルバムビガーに強い過敏反応(HR)を誘導する。この HR はタイプ III 型分泌システムに依存するため，トルバムビガーに注入されるエフェクターが非病原力因子(Avr)として認識されると考えられた。研究分担者の向原は本菌 RS1000 株が生産するほぼ全てのエフェクター (72 種)を同定した(Mukaihara et al., 2010, Mol. Plant-Microbe Interact. 23: 251)。そのうちの一つ Rip36 は，トルバムビガーで一過的に発現させると HR を誘導することと遺伝子破壊株で HR 誘導能が無くなることから，トルバムビガーに対する Avr と考えられた(未発表)。Rip36 は Zn プロテアーゼの活性ドメインを有し，病原性大腸菌の生産するエフェクター-NleD に相同性を示す。NleD は宿主自然免疫系の MAP キナーゼを切断し，炎症反応を阻害することにより病原性を示すことが知られているが(Baruch et al., 2011, EMBO J. 30: 221)，Rip36 の親和性ナス品種に対しての機能は全く明らかでない。また，トルバムビガーによる Rip36 認識機構も詳細は未知のままである。

2. 研究の目的

ナス科植物青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* RS1000 株のエフェクターRip36 はナスの台木品種トルバムビガーに強い過敏反応(HR)を誘導する。Rip36 は Zn プロテアーゼモチーフを有し，病原性大腸菌の生産するエフェクター-NleD に相同性を示す。NleD は宿主自然免疫系の MAP キナーゼを切断し，炎症反応

を阻害することにより病原性を示すことが知られているが，Rip36 の親和性ナス品種に対しての機能は全く明らかでない。そこで，本研究では Rip36 のナス品種に対する機能と標的タンパク質を解析し，エフェクターを介した親和性/非親和性決定の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では Rip36 の機能解析のために，Zn プロテアーゼモチーフ HELIH を失活型配列の HALIH に改変した変異 Rip36 をデザインし，両タンパク質を抵抗性トルバムビガーと罹病性千両 2 号で発現させ HR 誘導能並びに防御応答抑制能を解析する。また，RS1000 の *rip36* 変異菌をトルバムビガーと千両 2 号に接種し，感染レベルでの応答を野生株と比較する。さらに，Rip36 の標的タンパク質の同定のため，トルバムビガーと千両 2 号からそれぞれ cDNA ライブラリーを作成し，*rip36* を bait プラスミドに組み込み，酵母を用いた Two-Hybrid System により Rip36 と相互作用する標的タンパク質候補の cDNA を単離する。得られた候補タンパク質から真性の標的タンパク質を同定するために「HR 誘導」と「病害抵抗性」という異なる 2 つの観点から検証を行う。

4. 研究成果

(1) Rip36によるHR誘導機構の解析

Rip36のZnプロテアーゼモチーフHELIHを不活性型HALIHに改変させた*rip36*変異遺伝子(*rip36E149*)を作出した。この変異遺伝子並びに野生型*rip36*遺伝子を，アグロバクテリウムを介した一過的発現プラスミドを用いてトルバムビガーで発現させた。その結果，野生型*rip36*遺伝子は過敏反応(HR)を引き起こしたが，*rip36E149A*はHRを引き起こさなかつ

た。また、両遺伝子を *Ralstonia solanacearum* の非宿主タバコで発現させてもHRは誘導されなかった。さらに、*R. solanacearum*の野生株はトルバムビガーにHRを誘導したが、本菌の *rip36*欠損変異株 ($\Delta rip36$)並びにRip36のアミノ酸置換変異株 (*rip36E149A*)を接種してもHRは誘導されなかった。以上の結果は、Rip36がトルバムビガーに特異的にHRを誘導する非病原力因子であることを示している。さらに、*rip36E149A*はRip36と同レベルで植物細胞に移行することを確認した。このことは、Rip36のトルバムビガーに対するHR誘導能にプロテアーゼ活性が必須であることを示している。一方、 $\Delta rip36$ 、*rip36E149A*の両変異株ともに宿主ナスの罹病性品種千両2号に対する病原性に影響は与えず、Rip36は本菌の千両2号に対する病原性に必須ではないことが判明した。これらの成果は、2014年に国際誌 *Molecular Plant Pathology*において公表した。

(2) 酵母two-hybrid systemによるRip36標的タンパク質遺伝子の探索

無処理のトルバムビガーの葉から、あるいは *R. solanacearum*を接種3, 6時間後の葉からRNAを精製し、Clontech社のSMART法に従いcDNAを作成後、pGADT7-Recに組込み、GAL4の転写活性化ドメインとの融合タンパク質を生産するcDNAライブラリーを酵母Y187株で作成した。一方、*rip36*並びに*rip36E149A*をpGBKT7に挿入し、GAL4のDNA結合ドメインとの融合タンパク質として発現させるため、酵母Y2H Gold株に導入した。両酵母を接合後、常法に従って、Rip36あるいはRip36E149Aと相互作用するタンパク質のcDNAを検索した。その結果、いくつかの候補を得ることはできたが、確実な陽性クローンを得るには至らなかった。

(3) Rip36 と相同性を示す *Pseudomonas syringae* の HopH1 エフェクターの機能解析

HopH1 は Rip36 と同様 Zn プロテアーゼモチーフを有し、全ゲノム解析の終了した菌株のうち *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (DC3000)と *P. syringae* pv. *syringae* B728a (B728a)では *hopH1* を有するが *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (1448A)は有していない。そこでそれら菌株をトルバムビガーに接種すると、*hopH1* を保有する DC3000 と B728a は HR を誘導し、保有しない 1448a は誘導しなかった。更に DC3000 あるいは B728a の *hopH1* を 1448A に導入すると HR を誘導した。このことから *P. syringae* の *hopH1* も非宿主トルバムビガーに HR を誘導する非病原力因子として機能することが判明した。さらに、Zn プロテアーゼモチーフの 2 アミノ酸残基に変異を導入(E150AH153A)することにより HR 誘導活性を失い、Rip36 と同様、HopH1 においてもそのプロテアーゼ活性が HR 誘導に必要であることが推察された。

(4) *R. solanacearum* Rip36 を発現する形質転換シロイヌナズナの作出

Rip36 の植物細胞内機能の解析を目的に、デキサメタゾン (Dex) 誘導性プロモーターの制御下で Rip36 を誘導発現するシロイヌナズナを複数ライン作出した。Dex 存在下で Rip36 の発現を誘導した植物に顕著な生育障害は観察されなかった。このことは、Rip36 の植物細胞内での作用部位が細胞増殖・維持に関わる基本システム以外の経路、例えば自然免疫経路等である可能性を示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y. and Mukaihara, T. (2014)

Ralstonia solanacearum type III secretion system effector Rip36 induces hypersensitive

response in the nonhost wild eggplant

Solanum torvum. *Mol. Plant Pathol.* 15 (3):
297-303. DOI: 10.1111/mpp.12079

〔学会発表〕(計4件)

Kamrun Nahar, Iyo Matsumoto, Fumiko Taguchi, Yoshishige Inagaki, Takafumi Mukaihara, Yuki Ichinose. HopH1, a putative Zn-dependent protease, of *Pseudomonas syringae* induces hypersensitive response in non-host *Solanum torvum* Sw. cv. Torubamubiga. Symposium on Interdisciplinary Researches in Okayama, 2012. 11. 20-21., 岡山.

Kamrun Nahar, Iyo Matsumoto, Eriko Suetsugu, Fumiko Taguchi, Yuki Ichinose, Takafumi Mukaihara. Analysis of hypersensitive response of *Solanum torvum* Sw. cv. Torubamubiga induced by *Ralstonia solanacearum* Rip36 and *Pseudomonas syringae* HopH1 effectors. 第54回日本植物生理学会, 2013. 3. 21-23., 岡山.

向原隆文、小田賢司、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* における宿主域変異機構の解析、日本植物病理学会平成25年度大会、2013年3月27-29日、岐阜

Kamrun Nahar, Fumiko Taguchi, Yoshishige Inagaki, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Takafumi Mukaihara. HR-inducing activity of HopH1 from *Pseudomonas syringae*. 平成25年日本植物病理学会関西支部会, 2013. 9. 26-27., 岡山.

Yuki ICHINOSE, Fumiko TAGUCHI, *Ralstonia solanacearum* effector Rip36 induces strong immune response in the nonhost wild eggplant. 第87回日本細菌学会総会, 2014. 3. 26-28., 東京.

〔図書〕(計0件)

該当無し

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 勇規 (ICHINOSE YUKI)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授
研究者番号：50213004

(2) 研究分担者

向原 隆文 (MUKAIHARA TAKAFUMI)

岡山県農林水産総合センター・生物研・専門
研究員

研究者番号：80344406

(3) 連携研究者

(該当無し)