

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07320

研究課題名(和文) 青枯病菌エフェクターの宿主因子を介した活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for activation of *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAY in plant cells

研究代表者

向原 隆文 (MUKAIHARA, Takafumi)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：80344406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌のRipAYエフェクターは植物の自然免疫系に重要なグルタチオン(GSH)を分解する活性を持つ。RipAYは不活性型で発現するが、植物抽出液に含まれる真核細胞因子によって活性化され、植物のGSHプールを枯渇させるほど強力なGSH分解活性を発揮する。本研究ではRipAY活性化因子の精製を行い、その実体が植物の細胞質型チオレドキシシンであることを明らかにした。また、青枯病菌が持つ細菌型チオレドキシシンではRipAYが活性化されないことも確認した。RipAYの植物チオレドキシシンを介した宿主細胞内特異的な活性化メカニズムは、青枯病菌の生育に必須なGSHを酵素分解から守るために発達したと考えられる。

研究成果の概要(英文)： *Ralstonia solanacearum* injects virulence effector proteins into plant cells to succeed in infection. One of the effector proteins, RipAY, was found to function as a γ -glutamyl cyclotransferase, which degrades glutathione (GSH), a tripeptide that plays important roles in the plant immune system. The *in vitro* GSH degradation activity of RipAY is specifically activated by eukaryotic factors in the yeast and plant extracts. Interestingly, RipAY was activated by plant h-type thioredoxins that exist in large amounts in the plant cytosol in a thiol-independent manner. On the other hand, RipAY was not activated by bacterial thioredoxins. The high GSH degradation activity of RipAY is sufficient to suppress plant immunity during infection. However, GSH plays important roles in bacterial tolerance to various stresses and growth. The specific activation of RipAY in plant cells may be developed to prevent unwanted firing of its enzyme activity in bacterial cells.

研究分野：植物病理

キーワード：エフェクター グルタチオン 植物免疫 青枯病 チオレドキシシン

1. 研究開始当初の背景

植物と病原菌の相互作用において、感染の成立は両者のパワーバランスによって決定される。植物は病原菌由来の PAMP や Avr エフェクターを感知して病害抵抗反応を誘導し、病原菌はエフェクターをはじめとする病原性因子でこれを抑制する。ナス科作物の最重要病害「青枯病」の原因細菌 *Ralstonia solanacearum* においてもこの関係は同じであり、本菌が植物感染時に 70 種以上ものエフェクターを宿主細胞に注入している。

筆者らは、青枯病菌の RipAY エフェクターが宿主細胞内で γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (γ -GCT) として働き、植物の病害抵抗反応に重要なトリペプチド、グルタチオン (GSH) を特異的に分解することを見いだした。興味深いことに、大腸菌や青枯病菌の中で発現させた RipAY タンパク質は GSH 分解活性を示さず不活性型であったが、酵母細胞内で RipAY を発現させた場合や、大腸菌で作成した不活性型 RipAY に植物や酵母由来の細胞抽出液を加えた場合には活性型となり、強い GSH 分解活性を示した。この結果から、RipAY の GSH 分解活性が厳密に制御されていることが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、RipAY の GSH 分解活性を活性化する宿主植物因子の実体を明らかにし、「病原菌エフェクターの宿主因子を介した活性化機構」を解明する目的で行われた。

3. 研究の方法

不活性型の RipAY 組換えタンパク質を活性化する酵母及び植物因子を粗抽出液から精製し、実体を明らかにする。

4. 研究成果

(1) RipAY の GSH 分解活性は未知の真核細胞因子により活性化される

RipAY の GSH 分解活性を *in vitro* で詳細に調べるため、RipAY, RipAY E216Q 及び酵母の γ -GCT である YER163c タンパク質を大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を調整した。YER163c を *in vitro* で GSH と反応させると GSH が減少した (図 1)。しかしながら、RipAY では様々な条件を検討しても GSH の減少は観察されなかった。いくつかの病原菌エフェクターでは酵素活性が真核細胞因子で活性化されることが知られている。そこで RipAY の反応液中に酵母及び植物の粗抽出液を加えたところ、GSH 分解活性が認められた (図 1)。一方、RipAY の γ -GCT 活性を担う活性中心のグルタミン酸残基の変異体 (RipAY E216Q) では酵母及び植物の粗抽出液による活性化は観察されなかった。植物病原菌では、*Pseudomonas syringae* の AvrRpt2 エフェクターでは酵母や植物由来のシクロフィリンでエフェクターのプロテアーゼ活性が活性化されることがこれまでに報告されている。

RipAY の活性化にシクロフィリンが関与するかどうかを確かめたところ、全シクロフィリン遺伝子を欠損した酵母変異株の粗抽出液で RipAY が活性化された (図 1)。このことから、RipAY 活性化にはシクロフィリン以外の未知の真核細胞因子が関与することが明らかとなった。

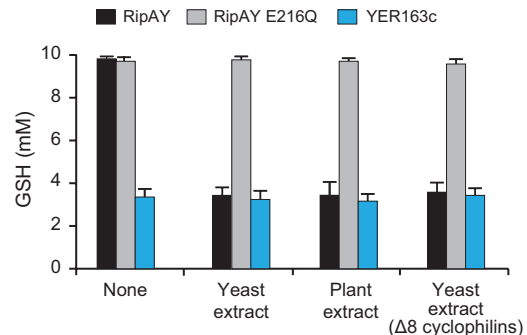


図 1. RipAY は未知の真核細胞因子により活性化される

(2) RipAY を活性化する真核細胞タンパク質の同定

RipAY を活性化する真核細胞因子を同定するため、調整が容易な酵母粗抽出液を各種手法で分画し、RipAY の活性化と関連するタンパク質を精製した。目的タンパク質の部分配列を質量分析で決定したところ、酵母チオレドキシリン TRX2 であることが明らかとなった。精製 TRX2 を用いて検証実験を行ったところ、TRX2 の量に応じて RipAY の GSH 分解活性は増大した (図 2)。一方、酵母の γ -GCT である YER163c の GSH 分解活性は TRX2 の添加によって全く変化しなかった。完全に活性化された RipAY は YER163c よりも 30~40 倍高い GSH 分解活性を示し、RipAY が非常に強力な GSH 分解酵素であることが明らかとなった。チオレドキシリンはほとんどの生物に共通に存在するタンパク質であるが、RipAY は大腸菌の精製チオレドキシリンでも活性化されなかった (図 2)。RipAY は青枯病菌由来のチオレドキシリンでも活性化されなかった (図 3)。この結果から、RipAY は病原菌細胞内では不活性型で維持されると考えられる。

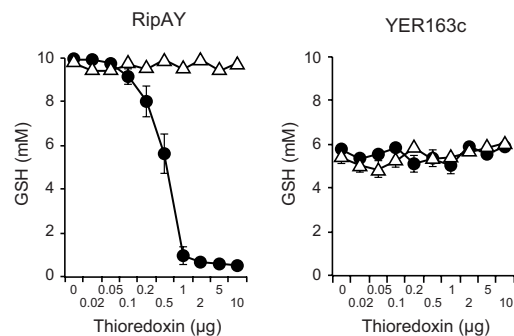


図 2. RipAY 及び YER163c の GSH 分解活性に対する精製チオレドキシリンの効果. 酵母チオレドキシリン TRX2 (●) 及び大腸菌チオレドキシリン TrxA (Δ) を反応液に添加し、GSH 量を測定した。

(3) RipAY は植物の細胞質型チオレドキシンのによってジスルフィド還元活性非依存的に活性化される

青枯病菌のエフェクターは植物細胞内で機能するため、RipAYは植物細胞内のチオレドキシンのにより活性化されると予想される。植物ではチオレドキシンの機能分化が進んでおり、シロイヌナズナでは少なくとも 20 のチオレドキシンのが存在し、7つのタイプ (*f*, *m*, *x*, *y*, *z*, *o* 及び *h*) に分類されている。RipAY は植物細胞内では細胞質に局在するため、細胞質型のチオレドキシンの *h* の効果を調べたところ、細胞質に多量に存在するチオレドキシンの *h1* から *h5* で活性化されることが明らかとなった (図 3)。一方、葉緑体のみ存在するチオレドキシンの *m1*, *f1*, *x*, *y1* 及び *z* では全く活性化されなかった。エフェクターの酵素活性が自身が働く場所にのみ局在する宿主因子で活性化されるよう上手くチューニングされているのは大変興味深い。

チオレドキシンのジスルフィド還元活性を介してタンパク質の活性を制御することが知られている。しかし、RipAY の活性化に本活性は必要でなかった。このことはジスルフィド還元活性を有する原核型チオレドキシンのが RipAY を活性化しない事実と良く一致し、チオレドキシンのによる未知のタンパク質活性化機構の存在が強く示唆される。

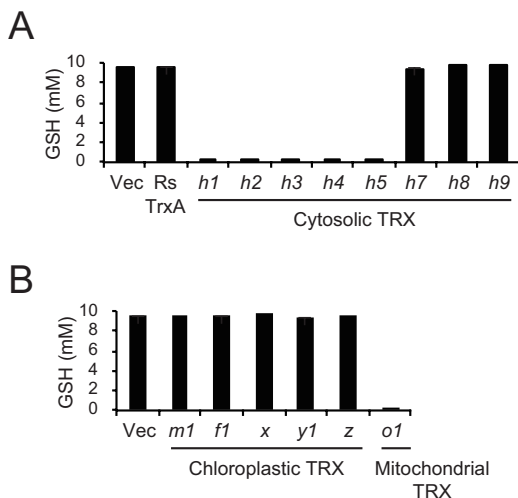


図 3. 植物チオレドキシンのによる RipAY の活性化. (A) 植物細胞質型 (B) 葉緑体型及びミトコンドリア型

6. GSH は青枯病菌の生育に必須である

青枯病菌の細胞内で RipAY が不活性化型で維持されることは、病原菌にとって GSH が非常に重要なことを強く示唆する。細菌では GSH は二段階で合成され、各段階で働く酵素は *gshA* 及び *gshB* 遺伝子にコードされている。青枯病菌の *gshAB* 変異株 (RS1701 株) を作成し、GSH を合成できないことを確認した。興味深いことに、RS1701 株では H_2O_2 やメチルグリオキサールに対する耐性が大きく低下しており、GSH が病原菌の酸化ストレス応答や解毒経路で重要な働きをしていることが明らかとなった。また、RS1701 株は

GSH を含まない最少培地中では完全に生育が停止することから、病原菌の生育に GSH が必須であることが示された (図 4)。以上の結果から、RipAY の活性は病原菌内の GSH を分解から守るために厳密に制御されていると考えられる。

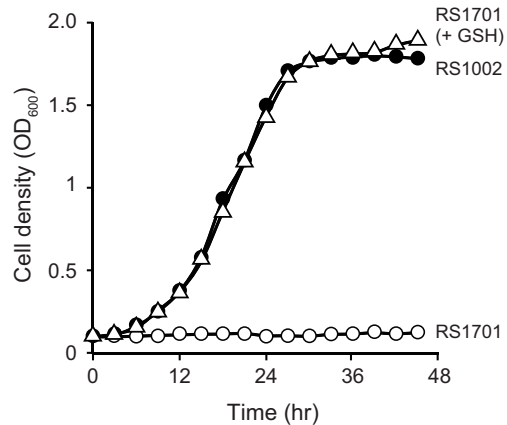


図 4. GSH 合成変異株 RS1701 の最少培地における増殖

まとめ

本研究から、青枯病菌の RipAY エフェクターが植物チオレドキシンので活性化される強力な GSH 分解酵素であり、植物の GSH プールを枯渇させて病害抵抗応答を抑制するという新奇な作用機序を持つ病原因子であることが明らかとなった (図 5)。植物チオレドキシンのに依存した RipAY の活性化機構は、病原菌自身にとっても重要な GSH を RipAY による分解から守る安全装置として発達したと考えられる。

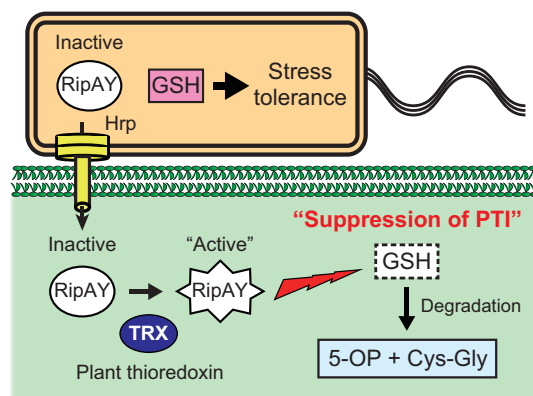


図 5. 植物と青枯病菌の相互作用における RipAY の役割

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Mukaihara, T., Hatanaka, T., Nakano, M., and Oda, K. *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAY is a glutathione-degrading enzyme that is activated by plant cytosolic thioredoxins and suppresses plant immunity. *mBio* 7:e00359-16 (2016).

DOI: 10.1128/mBio.00359-16

② Nakano, M., Oda, O., and Mukaihara, T. *Ralstonia solanacearum* novel E3 ubiquitin ligase (NEL) effectors RipAW and RipAR suppress pattern-triggered immunity in plants. *Microbiology* 163:992–1002 (2017)

DOI: 10.1099/mic.0.000495

〔学会発表〕（計6件）

① 澤井拓・一瀬勇規・山本幹博・松井英譲・能年義輝・豊田和弘・向原隆文・長田裕之. ナス科植物青枯病菌の病原力や増殖を制御する化合物の探索. 平成28年度日本植物病理学会大会、平成28年3月22日（岡山）

② 中野真人、小田賢司、向原隆文. 植物の基礎的抵抗性を抑制する青枯病菌エフェクターの網羅的解析. 第73回中国四国植物学会大会、平成28年5月14-15日（鳥取）

③ 中野真人、小田賢司、向原隆文. E3 ユビキチンリガーゼ活性を持つ青枯病菌エフェクターは植物の自然免疫を抑制する. 日本植物学会第80回大会、平成28年9月16-19日（沖縄）

④ 向原隆文・中野真人・小田賢司. 青枯病菌 RipP1 はナス台木トルバムビガーに認識されるマイナーな非病原力エフェクターである. 平成29年度日本植物病理学会大会、平成29年4月26日～28日（盛岡）

⑤ 中野真人・小田賢司・向原隆文. 植物の自然免疫を抑制する青枯病菌エフェクターの同定と機能解析. 平成29年度日本植物病理学会大会、平成29年4月26日～28日（盛岡）

⑥ 向原隆文. 敵を知って、植物を知る：ナス科作物青枯病に対するエフェクター支援育種. 第17回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成29年11月28日（岡山）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

該当なし

○取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向原 隆文 (MUKAIHARA, Takafumi)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：80344406