

令和元年5月23日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07617

研究課題名(和文) 青枯病菌エフェクターをツールとした過敏感細胞死メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of hypersensitive cell death mechanism by functional effectomics of *Ralstonia solanacearum* effectors

研究代表者

市村 和也 (Ichimura, Kazuya)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70321726

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)：本研究では、MEK2の構成的活性化(MEK2DD)によるHR様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクターを探索し、clone 42を同定した。clone 42の発現はクロロシスを誘導し、宿主の防御関連遺伝子の発現を増加させた。ベンサミアナタバコ葉におけるclone 42を発現するアグロバクテリウムの菌数を解析した結果、GFPを発現する対照と比較して優れた菌数の低下が見られた。よってclone 42は、宿主に認識される可能性が示唆された。以上より、clone42によるHR様細胞死抑制は、clone42の宿主認識により、MEK2DDを発現するアグロバクテリウムの感染効率低下に起因すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青枯病菌はナス科作物を含む200種類以上の植物に感染し、学術誌による投票では第2位の重要植物病原細菌であるにもかかわらず、病原性因子であるエフェクターの機能解析は他の植物病細菌と比較して報告例が少ない。本研究では、青枯病菌エフェクターの一つであるclone42が、タバコ属のモデル植物ベンサミアナタバコによって認識されることが示された。今後、本エフェクターの認識機構や病原性機能の解明につながる研究の出発点となり得る点は、学術的に意義がある。また、本エフェクターを認識する抵抗性遺伝子が同定された場合は、タバコ属植物の抵抗性強化に役立つ育種材料となり得る点は、社会的にも意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate a mechanism of hypersensitive (HR) cell death, the most important issue in plant immunity. In this study, we screened for the *Ralstonia solanacearum* effector and identified clone 42 that suppresses HR-like cell death induced by constitutive active form of MEK2 (MEK2DD). *Agrobacterium*-mediated expression of clone 42 in *Nicotiana benthamiana* resulted in chlorosis as well as increased expression of PR1. Infection of *Agrobacterium* expressing clone 42 in *N. benthamiana* leaves showed significant reduction compared to the control expressing GFP. These results suggested that clone 42 was recognized by the host. Taking into account, we conclude that the suppression of HR-like cell death by clone 42 is due to the reduced infection efficiency of coinfiltrated *Agrobacterium* expressing MEK2DD.

研究分野：植物病理学

キーワード：エフェクター 青枯病菌 ベンサミアナタバコ 細胞死 MAPキナーゼ経路

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物病原細菌は、病原性因子であるエフェクターを宿主細胞へ輸送する機構としてタイプ III 分泌系を持ち、エフェクターを宿主の細胞内へ注入する。細胞内へ分泌されたエフェクターは、パターン認識受容体自体および以降のシグナル伝達などを抑制し、pattern-triggered immunity を阻害することで感染を成立させようとする。一方、植物は抵抗性(R)タンパク質がエフェクターを直接または間接的に検出して、過敏感(HR)細胞死を誘導することで、病原菌を感染部位に封じ込め、感染を阻止する。

(2) MEK2 は、上流の MAPKKK である MAPKKK α 、そして MAP キナーゼの WIPK、SIPK と特異的な経路 (MAPKKK α -MEK2-WIPK/SIPK) を構成し、複数の R タンパク質が誘導する HR に必要とされる (Plant Cell 22:260, 2010)。恒常的活性型 MEK2^{DD} の過剰発現は、防御関連遺伝子の発現や ROS 生成を伴い、HR 様細胞死を誘導することが知られており、MEK2 は植物免疫において重要な役割を担うと考えられる。上記 MAP キナーゼ経路の下流では、転写因子 WRKY8 等のリン酸化を介して、HR 細胞死誘導における活性酸素種 (ROS) 生成に必須な、NADPH オキシダーゼをコードする *RbohB* 遺伝子の発現が活性化される (Plant Cell 27: 2645, 2015)。また、エチレンシグナルの細胞死への関与も示唆されているが (Cell Res. 18:422, 2008)、これらの関連などは不明である。しかしながら、MEK2^{DD} 誘導性 HR 様細胞死のメカニズムは十分解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は感染生理における重要課題である過敏感(HR)細胞死のメカニズムを解明する研究である。ナス科植物では複数の抵抗性(R)タンパク質が誘導する HR 細胞死に、MAPKKK α - MEK2 - WIPK/SIPK が構成する MAP キナーゼ経路が介在している。しかしながら、本経路の制御因子や本経路以降 HR 細胞死までの機構は十分に解明されていない。これらを明らかにすべく、MEK2 の構成的活性化である MEK2^{DD} による HR 様細胞死を指標に、ベンサミアナタバコ葉を用いたアグロインフィルトレーション法を活用した一過的に発現系により、HR 様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクターを探索する手法を新たに確立した。同定した青枯病菌エフェクターについて、MEK2^{DD} による HR 様細胞死過程のいずれの段階を抑制するか明らかにすると共に、細胞死抑制機構や青枯病菌の病原性への関与についても明らかにする。また、研究過程でベンサミアナタバコによって認識される青枯病菌エフェクターも同時に同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクターの探索と同定

青枯病菌は約 70 のエフェクターを保有し、他の植物病原細菌と比較して 2~3 倍多いエフェクターレパートリーを有している (BMC Genomics. 14:859, 2013)。申請者はこれらのエフェクターの中に、MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制するものも存在すると仮定した。申請者の研究室では、現在までに青枯病菌 GMI1000 株のエフェクターについてクローン化を実施した。さらに、クローン化した全てのエフェクターについて、ベンサミアナタバコを用いたアグロインフィルトレーションによる共発現を行い、MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制するエフェクターの探索を行った。

(2) clone 42 による MEK2^{DD} 誘導性 HR 様細胞死の抑制段階の解析

clone 42 による MEK2^{DD} 誘導性 HR 様細胞死の抑制が、MEK2^{DD} の発現に影響を与えているか解析するため、ベンサミアナタバコ葉において、clone42 と MEK2^{DD} をアグロインフィルトレーション法により共発現し、MEK2^{DD} のタンパクレベルおよび mRNA レベルを、ウェスタンブロット解析と RT-qPCR 解析によりそれぞれ検討した。

(3) clone 42 の細胞内局在解析

clone42 の GFP 融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、アグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコ葉で発現させた。GFP-clone42 は共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) clone 42 の各種変異型による MEK2^{DD} 誘導性 HR 様細胞死抑制の解析

clone42 の N 末端領域、C 末端領域、14-3-3 タンパク質結合モチーフ、ヌクレオシド-2 リン酸類縁体加水分解酵素ドメイン内の活性中心部位に相当する保存アミノ酸、以上に欠失またはアミノ酸置換を導入した変異型を作製した。これらを用いて、clone42 の MEK2^{DD} 誘導性 HR 様細胞死抑制能に与える影響を解析した。

(5) clone 42 のベンサミアナタバコ葉における単独発現による影響の解析

clone42 野生型および各種変異型を発現するアグロバクテリウムをアグロインフィルトレーション法によりベンサミアナタバコ葉で発現させ、発現部位に起こる変化を、日数を追って観察した。

(6) clone 42 を発現するアグロバクテリウムのベンサミアナタバコ葉における増殖の解析

clone 42 野生型および各種変異型を発現するアグロバクテリウムを、GFP 発現するアグロバクテリウムを対照として、ベンサミアナタバコ葉に注入し、その後発現箇所から葉片を採取し、単位面積あたりのアグロバクテリウムの菌数を計数した。

4. 研究成果

青枯病菌エフェクターはバイナリーベクターにクローン化し、MEK2^{DD} と共発現を行い、MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制するエフェクターをスクリーニングした。その結果、複数ポジティブクローンが得られ、初期に単離された clone42 を詳細に解析することとした。clone 42 は、N 末端領域の 14-3-3 タンパク質結合モチーフと、それ以外のヌクレオシド-2 リン酸類縁体加水分解酵素ドメインから構成されていた。ウェスタンブロット解析により、clone42 は MEK2^{DD} のみならず共発現したタンパク質のレベルを非

特異的に低下させていることが示された。この現象が転写抑制によるものであるかを確認するため、RT-qPCR を用いた発現解析を行った結果、タンパクレベルの低下は転写抑制が原因であることが明らかとなった。また、clone42 の単独発現においては、明瞭なクロロシスを誘導し、宿主の防御関連遺伝子の発現を増加させることも示されていた。よって clone42 は、宿主に何らかのメカニズムで認識される可能性が示唆された。clone42 の各種変異型を作製し、MEK2^{DD} 誘導性 HR 様細胞死の抑制、clone42 と共発現した MEK2^{DD} の mRNA レベル、clone42 によるクロロシスなどを解析したところ、C 末端欠損変異型では全ての現象が対照実験区と同等レベルに回復した。clone42 が C 末端領域に依存的に宿主に認識される可能性が考えられたため、各変異型を形質転換したアグロバクテリウムを用いて、ベンサミアナタバコ葉感染後の cfu を解析した結果、C 末端欠損変異型以外の菌数が優位に低下した。この結果から、clone42 を発現するアグロバクテリウムが存在すると、clone42 の宿主認識によって誘導される防御応答によって共発現している MEK2^{DD} の発現も抑制され、見かけ上 HR 様細胞死抑制が起こる可能性が強く示唆された。よって、これまで clone42 の病原性と考えられた転写抑制などの機能は、アグロバクテリウムの感染効率の低下に起因することが明らかとなった。また興味深いことに、clone42 の C 末端欠損変異型では一連の現象が認められなくなることから、宿主認識には C 末端が重要な役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Disruption of the MAMP-induced MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 pathway activates the TNL immune receptor SMN1/RPS6, Momoko Takagi, Kohei Hamano, Hiroki Takagi, Takayuki Morimoto, Kazuya Akimitsu, Ryohei Terauchi, Ken Shirasu, Kazuya Ichimura, Plant and Cell Physiology 査読有 60:778-787 (2019)
2. Evaluation of Various Cultivars of Actinidia species and Breeding Source *Actinidia rufa* for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 3, Gan Kasaki, Sawa Tanaka, Ayumi Ishihara, Chika Igarashi, Takayuki Morimoto, Kohei Hamano, Atsuko Endo, Saeko Sugita-Konishi, Mitsuki Tabuchi, Kenji Gomi, Kazuya Ichimura, Katsuhiko Suezawa, Mamoru Otani, Tetsuo Fukuda, Tetsuro Manabe, Toshio Fujimura, Ikuo Kataoka, Kazuya Akimitsu, Journal of General Plant Pathology 査読有 84:399-406 (2018)
3. 希少糖の農業資材利用の可能性について, 秋光 和也, 松平 一志, 安喜 絢花, 望月 進, 加野 彰人, 吉原 明秀, 五味 剣二, 市村 和也, 福元 健志, 小原 敏明, 重松 由夫, 石田 豊, 大谷 耕平, 何森 健, 日本農薬学会誌, 査読無 42, 99-103, 2017.
4. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3 Regulates Seed Dormancy in Barley, Shingo Nakamura, Mohammad Pourkheirandish, Hiromi Morishige, Yuta Kubo, Masako Nakamura, Kazuya Ichimura, Shigemi Seo, Hiroyuki Kanamori, Jianzhong Wu, Tsuyu Ando, Goetz Hensel, Mohammad Sameri, Nils Stein, Kazuhiro Sato, Takashi Matsumoto, Masahiro Yano, Takao Komatsuda, Current Biology 査読有 26:775-781 (2016)
5. SGT1 contributes to maintaining protein levels of MEK2^{DD} to facilitate hypersensitive response-like cell death in *Nicotiana benthamiana*, Kazuya Ichimura, Takehito Shinzato, Miki Edaki, Hirofumi Yoshioka, Ken Shirasu, Physiological and Molecular Plant Pathology 査読有 94:47-52 (2016)
6. The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation, Kenta Yamada, Koji Yamaguchi, Tomomi Shirakawa, Hirofumi Nakagami, Akira Mine, Kazuya Ishikawa, Masayuki Fujiwara, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Kazuya Ichimura, Yuka Kobayashi, Hidenori Matsui, Yuko Nomura, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Yoichiro Fukao, Tamo Fukamizo, Kenichi Tsuda, Ken Shirasu, Naoto Shibuya, Tsutomu Kawasaki, EMBO Journal 査読有 35:2468-2483 (2016)

[学会発表](計 7 件)

1. MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクター clone42 の機能解析, 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会, 2018 年 9 月, 山口大学吉田キャンパス 小坂沙波, 佐藤幹也, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也.
2. MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制する青枯病菌 F-box エフェクターの機能解析, 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会, 2018 年 9 月, 山口大学吉田キャンパス 村尾あゆみ, 新里剛一, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也.
3. MEK2^{DD} による細胞死を抑制する青枯病菌エフェクター clone99 の解析, 日本植物病理学会第 53 回植物感染生理談話会, 2018 年 8 月, 高知大学農林海洋科学部 大路美咲, 枝木美樹, 北村理人, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也.
4. MEK2^{DD} による HR 様細胞死を抑制する青枯病菌エフェクター clone42 の機能解析, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017 年 4 月, マリオス アイーナ・岩手県民情報交流センター 小坂沙波, 佐藤幹也, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也.

5. 植物の過敏感反応様細胞死を抑制する青枯病菌アンキリンリピートエフェクターの解析. 平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会, 2016 年 9 月 静岡市グランシップ
枝木 美樹, 北村 理人, 田口 義人, 吉岡 博文, 秋光 和也, 市村和也.
6. 植物の過敏感反応様細胞死を抑制する青枯病菌アンキリンリピートエフェクターの解析. 日本植物病理学会平成 28 年度植物感染生理談話会, 2016 年 8 月 神戸市シーパル須磨.
枝木美樹, 北村理人, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也.
7. 青枯病菌 F-box タンパク質エフェクターの過剰発現はベンサミアナタバコにおける MEK2^{DD} が誘導する HR 様細胞死を抑制する. 日本植物病理学会平成 28 年度植物感染生理談話会, 2016 年 8 月 神戸市シーパル須磨.
新里剛一, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也, 市村和也.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/kichimura>

<https://researchmap.jp/read0147770>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:
ローマ字氏名:
所属研究機関名:
部局名:
職名:
研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:小坂沙波, 村尾あゆみ, 大路美咲, 枝木美樹, 北村理人, 新里剛一, 佐藤幹也, 田口義人, 吉岡博文, 秋光和也

ローマ字氏名:Sanami Kosaka, Ayumi Murao, Misaki Ohji, Miki Edaki, Masato Kitamura, Takehito Shinzato, Mikiya Sato, Yoshito Taguchi, Hirofumi Yoshioka, Kazuya Akimitsu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。