

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15847

研究課題名(和文) 青枯病抵抗性タンパク質による病原菌認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogen recognition system mediated by bacterial wilt resistant protein

研究代表者

中野 真人 (Nakano, Masahito)

岡山大学・環境生命科学研究所・特別研究員 (PD)

研究者番号：60756708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：青枯病菌はナス科作物を加害する植物病原細菌である。ニコチアナ属植物は青枯病菌のRipBエフェクターを認識し防御応答を誘導する。本研究では、RipB認識に関わる新規宿主因子を同定するとともに、この認識を阻害する青枯病菌の病原性機構を明らかにすることを目的とした。ウイルス誘導遺伝子サイレンシング法を用いた解析により、Psb0とPsbPはRipB認識に関わる因子として重要な役割を果たすことを明らかにした。また、RipB認識を阻害する青枯病菌エフェクターを同定するとともに、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを用いて当該エフェクターと相互作用する宿主因子を複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青枯病菌の宿主範囲は広く、その病原性機構は不明な点が多い。そのため、本菌に対する防除方法を開発する上で大きな障壁となっている。本研究では、青枯病菌エフェクターの機能解析を通して、青枯病菌が植物からの認識を回避する病原性分子機構を解明した。また、青枯病抵抗性の誘導に関わる情報伝達経路の一端が明らかになり、病害防除方法を確立する上で有益な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Ralstonia solanacearum is the causal agent of bacterial wilt in solanaceous crops. Nicotiana plants recognize RipB effector from R. solanacearum and induce defense responses. In this study, we aimed to identify a novel host factor involved in RipB recognition and to clarify the virulence mechanism of R. solanacearum that inhibits the recognition. By using virus-induced gene silencing, we found that Psb0 and PsbP play important roles as factors involved in RipB recognition. In addition, we identified R. solanacearum effectors that inhibit RipB recognition and found several host factors that interact with the effectors using yeast two-hybrid screening.

研究分野：植物病理学

キーワード：青枯病 病害抵抗性 エフェクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、広い宿主範囲を有する植物病原細菌であり、ナス科作物を中心に 200 種類以上の植物を加害する。植物が青枯病菌を認識して病害抵抗性を誘導する分子機構や青枯病菌がこの認識を回避する病原性機構については不明な点が多い。そのため、青枯病菌に対する防除方法を開発する上で大きな障壁となっている。

### 2. 研究の目的

ニコチアナ属植物は青枯病菌の 3 種類のエフェクター RipB、RipP1、および RipAA を非病原力因子 (Avr) として認識し、防御応答を誘導することで青枯病菌の感染を阻害する。しかしながら、この認識機構や下流の情報伝達経路については不明な点が多い。また、青枯病菌の中にはニコチアナ属植物に感染する菌株が存在することから、青枯病菌は Avr 認識を阻害するエフェクターを有すると考えられる。本研究では、Avr 認識に関与する免疫システムとこれを回避する青枯病菌の病原性機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子ノックダウン植物の作出

標的植物遺伝子の部分断片をウイルス誘導ジーンサイレンシング用ベクターに連結し、アグロバクテリウムを導入した。このアグロバクテリウムをベンサミアナタバコの幼苗に感染させ、遺伝子ノックダウン植物を作出した。

#### (2) Avr 認識を阻害するエフェクターの探索

青枯病菌 RS1000 株の有する約 70 種類のエフェクター遺伝子を恒常的発現バイナリーベクターに連結した。また、青枯病菌の Avr エフェクターをエストラジオール誘導性発現ベクターに連結した。アグロバクテリウムを介してこれらエフェクターをベンサミアナタバコの本葉で共発現させ、エストラジオール処理後に形成される過敏細胞死 (HR) の有無を観察した。

#### (3) エフェクター標的植物因子の同定

青枯病菌を接種したシロイヌナズナ葉から RNA を調整し、酵母ツーハイブリッドスクリーニング用ライブラリーを作製した。エフェクター遺伝子を有するベイト酵母とシロイヌナズナ遺伝子ライブラリーを有するプレイ酵母を接合した後、選択培地 (TDO) 上で陽性クローンを選抜した。

### 4. 研究成果

#### (1) Avr 認識に関与する植物因子の同定

光合成関連タンパク質である NbPsbO と NbPsbP が Avr 認識に関与するかを調べるため、ウイルス誘導ジーンサイレンシング法により両遺伝子をノックダウンした植物を作出した。NbPsbO あるいは NbPsbP ノックダウン植物において、RipB 認識時に誘導される活性酸素種の生成が顕著に減弱した (図 1A)。また、両ノックダウン植物では青枯病菌感染時に引き起こされる萎凋症状の進展が促進された (図 1B)。萎凋症状の促進はベンサミアナタバコだけでなく、ナスやトウガラシにおいても当該相同遺伝子をノックダウンすることにより観察された (図 1C, D)。これらの結果から、NbPsbO と NbPsbP は RipB 認識に関与しており、青枯病抵抗性における PsbO と PsbP の役割はナス科植物において広く保存されていると考えられた。

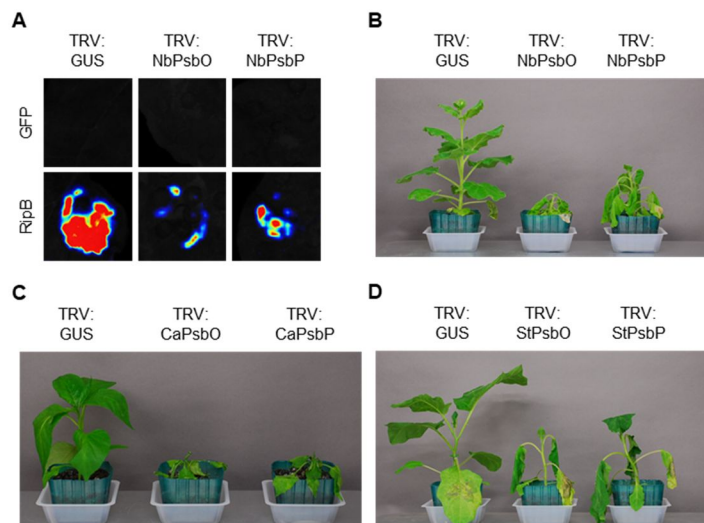


図 1. *PsbO* と *PsbP* の機能解析

## (2) Avr 認識を阻害するエフェクターの探索

Avr の認識を阻害する青枯病菌エフェクターを同定するため、HR の有無を指標としたスクリーニングを実施した。アグロバクテリウムを介して青枯病菌 RS1000 株が有する約 70 種類のエフェクターと Avr エフェクターをベンサミアナタバコの本葉で一過的に発現させ、エストラジオール処理後に形成される HR の有無を観察した。その結果、RipAA が誘導する HR の形成を顕著に抑制するエフェクターとして RipI、RipAC、RipAP、および RipAU を見出した (図 2A)。これらエフェクターの内、RipAC は RipP1 が誘導する HR の形成や RipB が誘導する活性酸素種の生成も抑制した。RipAC の推定アミノ酸配列内にはタンパク質間相互作用に關与するロイシンリッチリピート (LRR) 構造が認められた。LRR を欠損させた RipAC<sup>LRR-</sup> は野生型 RipAC とは対照的に、RipB、RipP1、および RipAA が誘導する防御応答を阻害しなかった (図 2B,C)。これらの結果から、RipAC は LRR を介して Avr 認識を阻害することが示唆された。

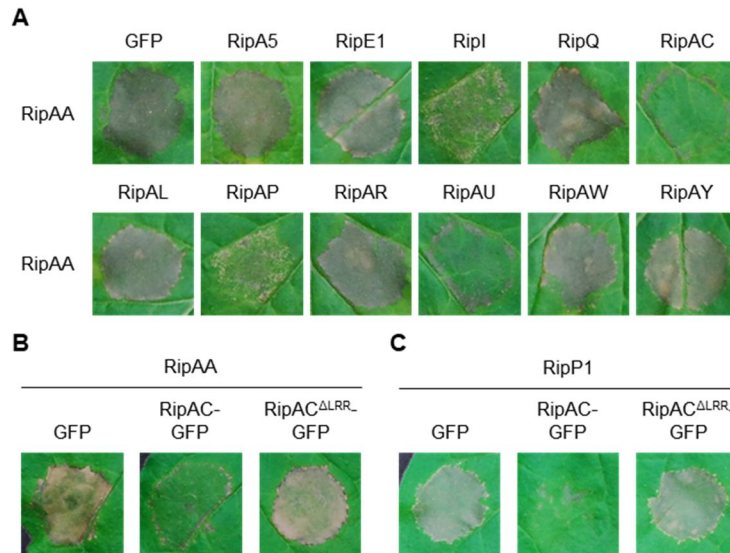


図 2. HR 阻害活性を有するエフェクター

## (3) RipAC 標的的植物因子の同定

RipAC の標的的植物因子を探索するため、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを実施した。その結果、分子シャペロン複合体の構成因子 SGT1 を同定した (図 3A)。植物細胞内において、RipAC は SGT1 と同様に細胞質に局在化したことから、SGT1 は RipAC の有望な標的因子であると考えられた。RipAC はベンサミアナタバコの NbSGT1 と酵母細胞内で相互作用した。NbSGT1 をノックダウンした植物において RipAA を発現させたところ、HR の形成が顕著に抑制された (図 3B)。また、当該ノックダウン植物においては、RipP1 が誘導する HR の形成や RipB が誘導する活性酸素種の生成も抑制された。これらの結果から、青枯病菌は感染時に RipAC を介して分子シャペロン複合体を標的とすることで Avr 認識時の防御応答を回避すると推察された。

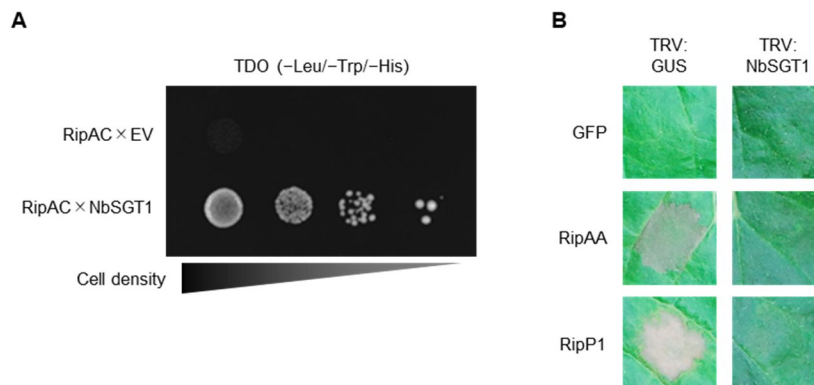


図 3. NbSGT1 の機能解析

RipAC は HR の形成を抑制するだけでなく、鞭毛構成ペプチド flg22 により誘導される活性酸素種の生成や防御関連遺伝子の発現等のパターン認識免疫も顕著に抑制する。しかしながら、これらの免疫応答は NbSGT1 ノックダウン植物において阻害されなかった。このことから、SGT1 以外に RipAC の標的因子が存在すると考えられた。酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより得られた相互作用候補因子の中に、RipAC と同様に植物細胞質内に局在化するリン酸化タン

パク質を同定した。当該因子は酵母と植物細胞内で RipAC と相互作用することが明らかになった。当該因子をノックダウンした植物において、RipAC の一過的発現により抑制される一連の免疫反応が顕著に阻害された。これらの結果から、青枯病菌は RipAC を介して複数の植物因子を標的とすることで感染時に誘導される様々な種類の免疫応答を回避し、宿主へ効率的に感染するものと推察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakano Masahito, Ichinose Yuki, Mukaiharu Takafumi  | 4. 巻<br>61                |
| 2. 論文標題<br>Ralstonia solanacearum Type III Effector RipAC Targets SGT1 to Suppress Effector-Triggered Immunity  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Plant and Cell Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>2067 ~ 2076 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/pcp/pcaa122   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Kiba Akinori, Nakano Masahito, Hosokawa Miki, Galis Ivan, Nakatani Hiroko, Shinya Tomonori, Ohnishi Kouhei, Hikichi Yasufumi  | 4. 巻<br>71                |
| 2. 論文標題<br>Phosphatidylinositol-phospholipase C2 regulates pattern-triggered immunity in Nicotiana benthamiana  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Experimental Botany  | 6. 最初と最後の頁<br>5027 ~ 5038 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jxb/eraa233   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Nakano Masahito, Mukaiharu Takafumi   | 4. 巻<br>20                |
| 2. 論文標題<br>Comprehensive Identification of PTI Suppressors in Type III Effector Repertoire Reveals that Ralstonia solanacearum Activates Jasmonate Signaling at Two Different Steps | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>E5992       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms20235992  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Nakano Masahito, Mukaiharu Takafumi   | 4. 巻<br>20                |
| 2. 論文標題<br>The type III effector RipB from Ralstonia solanacearum RS1000 acts as a major avirulence factor in Nicotiana benthamiana and other Nicotiana species                     | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Plant Pathology   | 6. 最初と最後の頁<br>1237 ~ 1251 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/mpp.12824   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

〔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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|