

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 31 日現在

機関番号：16201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580095
 研究課題名（和文） 酵母ジェネティックアレイによる病原菌エフェクター宿主標的分子の網羅的探索
 研究課題名（英文） Global analysis of host targets of pathogen effector using yeast genetic array system
 研究代表者
 田淵 光昭（TABUCHI MITSUAKI）
 香川大学・農学部・准教授
 研究者番号：00294637

研究成果の概要（和文）：

多くの植物や動物に感染する病原菌は、Ⅲ型分泌装置を用いて宿主細胞質にエフェクタータンパク質を直接注入することで感染を成立させている。本研究では、植物病原菌である青枯病菌由来の病原因子エフェクターを酵母発現系により解析し、青枯病菌感染戦略の分子メカニズムの解明を目的とした。青枯病菌エフェクター遺伝子 38 個からその発現により酵母に強い増殖阻害を引き起こすエフェクターを 5 つ単離した。これらエフェクターの中で、あらゆる生物種間で保存されたドメインを有する REY4 について、酵母遺伝学により標的因子の探索を行ったところ、酵母細胞壁合成制御シグナル伝達経路に異常を示す変異株では、REY4 に対して超感受性を示すことが明らかになった。これより、REY4 は、酵母細胞壁合成制御シグナル伝達経路と遺伝的に相互作用する酵母内因子を標的としていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Numerous bacterial pathogens of plants and animals utilize specialized secretion apparatus such as the type III secretion system to inject effector proteins directly into the host cell cytoplasm. Consequently, translocated effector proteins manipulate host cellular processes to promote infection and ultimately cause disease. In this study, we aimed to analyze the pathogen effectors from the plant pathogenic bacteria, *Ralstonia solanacearum* using yeast expression system and reveal the molecular mechanism of the strategy for *R. solanacearum* infection. Through the screening of 38 effectors from *R. solanacearum* GMI1000, we identified 5 effectors that caused severe growth inhibition to yeast cells. One of these effectors, REY4 protein, which has a domain conserved across phyla, was analyzed by the yeast genetic array system to identify the cellular target(s) in yeast. This screening identified that mutants having defect in the cell wall integrity MAP kinase cascade are hyper-sensitive to REY4-expression compared to wild-type cells. This result suggests that REY4 inhibits the pathway(s), which genetically interacts with the cell wall integrity MAP kinase cascade.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：微生物利用学

キーワード：病原菌エフェクター・酵母・ジェネティックアレイ

1. 研究開始当初の背景

多くの病原菌は、Ⅲ型またはⅣ型分泌装置と呼ばれる注射針のような構造物を介して宿主細胞中にエフェクターと呼ばれる病原因子を直接注入することにより、その病原性を発現する。エフェクターの分子機能の解明は、病原菌の感染戦略を理解する上で重要であり、新たな抗菌薬の標的としても注目されている。しかし、エフェクターの多くは、既知のタンパク質との相同性が見られないため、一次構造からその機能を推定することが困難な状況にある。

酵母は、単細胞真核生物であり、細胞骨格制御、小胞輸送、細胞分裂、シグナル伝達などの細胞機能が動物や植物などの高等真核生物のそれらと類似していることより、宿主細胞機能の攪乱に機能する病原菌エフェクターが酵母カウンターパートに対して同様の作用を有することが期待される。我々は、酵母発現系を用いて効率にエフェクター機能を解析するために、Gateway system とドキシサイクリン誘導性プロモーター (Tet-off system) を組み合わせユニークな病原菌エフェクター網羅的解析システムを構築している (Tabuchi, et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, **73**, 2261-67, 2009)。

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、トマト、ナス、キュウリなどのナス科植物をはじめ、200 種以上もの幅広い植物に感染し、枯死させる農業上最も深刻な被害をもたらす病原性細菌の一つである。青枯病の病原性の発現にはⅢ型分泌装置とそのエフェクターが必須であり、エフェクター機能の解明は、本菌の感染戦略の分子レベルでの理解に不可欠である。しかし、青枯病菌は、他の植物病原菌と比較して非常に多くのエフェクターを有すること (70 種以上)、また、多くのエフェクターは、単独で破壊した場合においても病原性にほとんど影響がないことから重複した機能を有すること、非宿主植物を用いた場合においては、エフェクター依存的な過敏反応のためにエフェクター機能がマスクされ、エフェクターの分子機能の解析が困難なことなどから未だに多くのエフェクターの分子機能が明らかになっていない。農業上における本菌の重要性からもエフェクターの分子機能を解明することで、分子レベルでの感染戦略に基づいた防除法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、青枯病菌エフェクターの機能解

析を目的として、以下の3点について研究を行った。

- (1) 酵母発現系により解析可能な青枯病菌エフェクターの探索
- (2) 酵母に増殖抑制を引き起こす青枯病菌エフェクターの酵母細胞内における局在解析
- (3) 酵母ノックアウトライブラリーを用いた遺伝学的解析による青枯病菌エフェクターの標的因子の探索

3. 研究の方法

(1) 青枯病菌エフェクター酵母発現プラスミドの構築

共同研究者のフランス国立農業研究所の Stephan Genin 博士から分よされた Gateway ドナーベクター上に構築されたエフェクター 29 個及び当研究室において *R. solanacearum* GMI1000 株由来ゲノム DNA を鋳型として PCR により増幅したエフェクター 9 個を酵母 Tet-off 発現ベクターに LR 反応により組み込み青枯病菌エフェクター 38 個について酵母発現ベクターを構築した。

(2) 酵母に増殖阻害を引き起こす青枯病菌エフェクターのスクリーニング

酵母 Tet-off 発現ベクターに組み込んだ青枯病菌エフェクター遺伝子 38 個を酵母野生株 BY4743 株に網羅的に形質転換し、得られたクローニンについて、非誘導培地で培養後、誘導培地にスポットした。エフェクター発現により空ベクターと比較して酵母に増殖阻害を引き起こすエフェクターを選別し、更に *GALI* プロモーターベクターにて、増殖抑制を確認した。

(3) エフェクター酵母細胞内局在の解析

酵母に増殖抑制を引き起こしたエフェクターについて、GFP との融合遺伝子を構築し、酵母細胞内におけるエフェクターの細胞内局在を GFP の蛍光を指標として解析した。

(4) 酵母ジェネティックアレイ解析によるエフェクター標的因子の探索

酵母ホモ接合型ノックアウトライブラリーにエフェクター発現プラスミドを網羅的に形質転換し、エフェクター発現により野生株と比較して超感受性を示す酵母変異株を単離し、得られた変異株の原因遺伝子をエフェクターと遺伝的に相互作用する遺伝子とした。

4. 研究成果

(1) 酵母に増殖阻害を引き起こす青枯病菌エフェクターの探索

酵母発現ベクターに組み込んだ 38 個の青枯病菌エフェクターを酵母に形質転換し、誘導培地において強い増殖抑制を示したエフェクターを 5 つ単離した (Fig. 1)。得られた

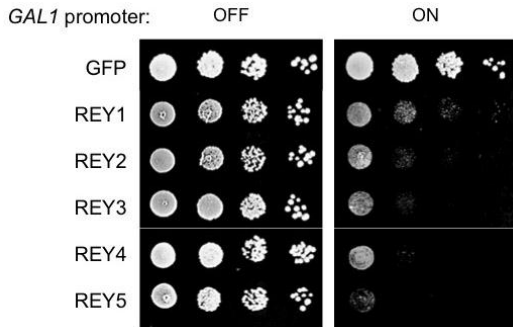


Fig 1. 酵母増殖阻害を引き起こす青枯病菌エフェクター
青枯病菌エフェクター 38 個を酵母にそれぞれ発現させることにより、エフェクター発現により酵母に強い増殖阻害を引き起こす青枯病菌エフェクター 5 つ (REY1~5) を単離した。

エフェクター遺伝子を REY1~5 (*Ralstonia Effector inhibiting Yeast growth*) とした。REY1~5 のアミノ酸配列を元に Pfam により機能ドメインの検索を試みたところ、REY4 においてのみ、大腸菌からヒトまで保存された機能未知ドメインが見出されたが、それ以外については、特徴的なドメイン・モチーフは見出されなかった。REY4 は、大腸菌からヒトまでそのホモログが存在し、これらホモログタンパク質と REY4 との系統樹解析を行ったところ (Fig. 2)、青枯病菌やスイカ果実汚

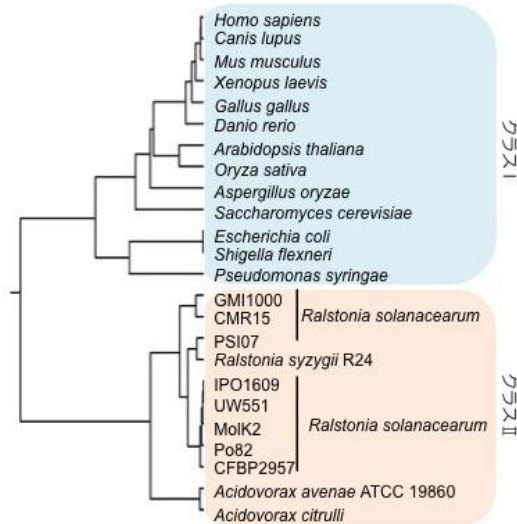


Fig 2. REY4 とそのホモログの系統樹解析

各種生物間で保存された機能未知ドメインを有する REY4 について、各種生物由来のホモログタンパク質との系統樹解析を行った。青枯病菌やウリ科植物の病原菌である *Acidovorax* 属菌由来のホモログタンパク質は、ヒトやその他多くの生物種由来のホモログタンパク質と進化上明らかに異なるクラスに分類された。

斑細菌病の原因菌である *Acidovorax citrulli* などの植物病原菌由来のホモログタンパク質 (クラス II) とヒト、酵母やその他生物由来

のホモログタンパク質 (クラス I) とでは、進化的に全く異なる枝葉に分類された。また、興味深いことに青枯病菌は、REY4 以外にも一つのパラログ遺伝子を持っており、この遺伝子産物は、系統樹解析からヒトや酵母のホモログと同じクラス I に分類された。これより、青枯病菌は、既存のホモログ遺伝子を利用してエフェクターとして REY4 遺伝子を進化の過程で獲得したことが推測された。

(2) エフェクターの酵母細胞内局在の解析

次に、エフェクターの酵母細胞内における作用部位を明らかにすることを目的として、REY1~5 について、GFP 融合遺伝子を作製し、酵母細胞内におけるそれぞれのエフェクターの細胞内局在を、GFP 蛍光を指標として解析した (Fig. 3)。

その結果、それぞれのエフェクターは酵母

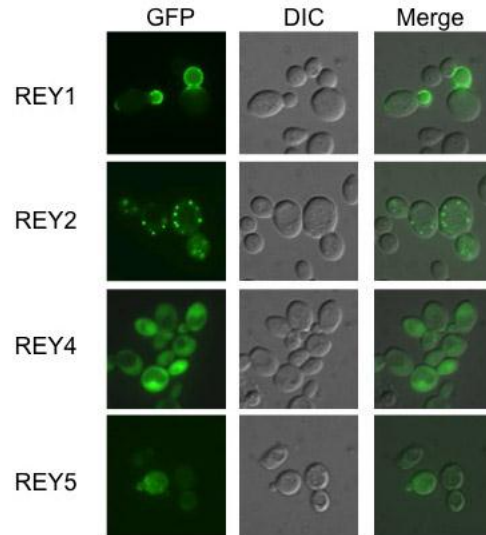


Fig 3. 青枯病菌エフェクターの酵母細胞内局在の解析

酵母増殖阻害を引き起こすエフェクターについて、GFP 蛍光を指標として細胞内局在を解析した。それぞれのエフェクターは酵母細胞内で特徴的な細胞内局在を示した。

細胞内において異なった局在を示した。興味深いことに REY1 は、酵母細胞内において上細胞膜に特異的に局在した。REY1 は、青枯病菌株間の宿主域決定に関わる非病原性力遺伝子として同定されており、この特徴的な局在が本遺伝子の病原性発現における機能とどのように関連性があるのか非常に興味深い。また、酵母細胞内でのエフェクタータンパク質の発現を確認するため、GFP 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより GFP 融合エフェクタータンパク質を検出した (Fig. 4)。その結果、得られたそれぞれのエフェクタータンパク質のバンドは、それぞれのエフェクタータンパク質の推定分子量とほぼ一致した。これより、各エフェクタータンパク質が、正しく酵母細胞内で発現していることが確認された。

(3) 酵母ジェネティックアレイ解析によるエフェクター標的因子の探索

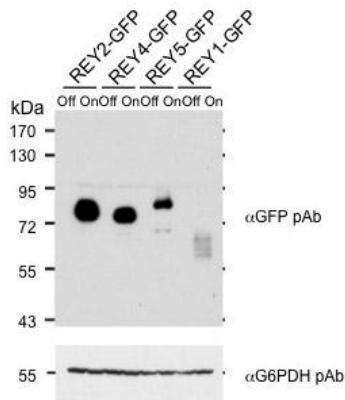


Fig. 4. ウェスタンブロットニングによるエフェクタータンパク質の検出。酵母増殖阻害を引き起こすエフェクターについて、タンパク質の発現をGFP抗体により検出した。それぞれのタンパク質は、推定分子量とほぼ一致する位置に検出された。

エフェクター酵母内標的因子を探索するために、酵母ジェネティックアレイ解析を行った。まず最初に解析するエフェクターとして、唯一機能ドメインが予測された REY4 について、解析を行った。ドキシサイクリン (Dox) により発現調節可能な酵母発現ベクターに REY4 遺伝子を組み込み、Dox 依存的に REY4 発現がコントロールできるプラスミドを構築した。本プラスミドを約 5000 株からなる酵母ホモ接合型ノックアウトライブラリー網羅的に形質転換し、Dox により発現レベル調節することで、低レベルの REY4 発現下において野生株よりも強い感受性を示す REY4 超感受性株をスクリーニングした。現在までに、約 2000 株のスクリーニングを終了した。その結果、cell wall integrity MAP キナーゼカスケードに異常を示す変異株 (*bck1* Δ および *slt2* Δ 株) においては、REY4 の低レベル発現下においても、野生株と比較して顕著に強い増殖阻害作用が見られた (Fig. 5)。これより、REY4 が標的とする酵母遺伝

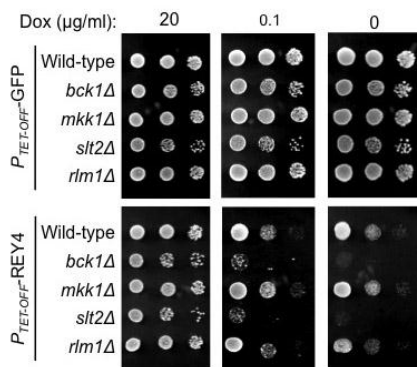


Fig. 5. Cell wall integrity MAP kinaseカスケードの異常は、REY4に超感受性になる酵母ノックアウトライブラリーにREY4発現プラスミドを網羅的に形質転換し、REY4に超感受性を示す変異株をスクリーニングした。その結果、cell wall integrity MAP kinaseカスケードの変異株では、低レベルのREY4発現に対しても超感受性を示すことが明らかとなった。

子は、cell wall integrity MAP キナーゼ経路と

遺伝的に相互作用することが考えられた。

SLT2 と遺伝的に相互作用する遺伝子は、SGD データベースの情報から 90 個以上の遺伝子が知られており、今後残りのノックアウトライブラリーをスクリーニングすることで、REY4 標的遺伝子の絞り込みを行う必要がある。

酵母ジェネティックアレイ解析により、REY4 の標的因子が同定されたならば、今後さらに、残りのエフェクターについても同様の解析を行うことにより、青枯病菌の宿主植物への感染戦略を分子レベルで解明することが可能であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 中川智絵、酵母発現系を用いた植物病原菌エフェクターの機能解析、第 29 回 YEAST WORKSHOP、2011 年 11 月、香川
- ② 長谷川純一、酵母発現系を用いた植物病原菌エフェクターの標的遺伝子の探索、日本農芸化学会中四国支部第 33 回講演会 (例会)、2012 年 6 月、松山
- ③ 長谷川純一、酵母発現系を用いた植物病原菌エフェクターの標的遺伝子の探索、酵母遺伝学フォーラム 第 45 回研究報告会、2012 年 9 月、京都
- ④ 長谷川純一、酵母発現系を用いた植物病原菌エフェクターの機能解、第 30 回 YEAST WORKSHOP、2012 年 11 月、山口
- ⑤ 忻詩博、酵母ノックアウトライブラリーを用いた青枯病菌病原因子エフェクターの標的因子の探索、第 30 回 YEAST WORKSHOP、2012 年 11 月、山口
- ⑥ 東構真城、酵母細胞内において娘細胞膜に特異的に極性輸送される青枯病菌エフェクターの局在化機構の解析、第 30 回 YEAST WORKSHOP、2012 年 11 月、山口
- ⑦ 藤澤穂乃香、TAP タグを用いた青枯病菌エフェクターの酵母内標的タンパク質の探索、第 30 回 YEAST WORKSHOP、2012 年 11 月、山口

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 光昭 (MITSUAKI TABUCHI)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：00294637

(2)研究分担者
田中 直孝 (NAOTAKA TANAKA)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号：60324109