

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580072

研究課題名(和文)大規模ゲノム置換技術を用いた青枯病菌の非宿主抵抗性打破機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of host range expansions in *Ralstonia solanacearum* by using large-scale genomic exchange

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・研究員

研究者番号：80344406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナス台木「ヒラナス」及び「トルバム・ピガー」は青枯病の防除に広く利用されてきたが、近年、これらの台木を発病させる青枯病菌が出現した。宿主域変異の分子機構を解明するため、ヒラナスを発病させる青枯病菌(III群菌)とヒラナスおよびトルバム・ピガーを発病させる青枯病菌(IV群菌)のエフェクターレパートリーを両台木に感染できないIII群菌と比較した。その結果、ヒラナスとトルバム・ピガーはともに青枯病菌のRip36エフェクターを認識して強い抵抗反応を起動していることが明らかとなった。ヒラナスの青枯病抵抗性はRip36認識に起因していたが、トルバム・ピガーはさらに別の非病原力(Avr)因子も認識していた。

研究成果の概要(英文)：Solanum integrifolium and Solanum torvum are useful rootstocks to avoid bacterial wilt of eggplants. In order to know the mechanism of host range expansion in *R. solanacearum*, we compared type III effector repertoires among *R. solanacearum* strains with different host ranges. Three effector genes, namely, rip10, rip36 and popP1, were not detected in the group III or group IV strains, which are virulent on *S. integrifolium*. Mutation analysis revealed that Rip36 is specifically recognized as an avirulence factor by both *S. integrifolium* and *S. torvum*. The rip36 mutant of the group II strain, which is avirulent on *S. torvum*, effectively cause disease in *S. integrifolium*. However, the rip36 mutant could not cause disease in *S. torvum* despite the increased multiplication, indicating that another avirulence factor for *S. torvum* exists in this strain. These findings suggest that the group IV strains are generated from the group III strains by as yet unidentified mutations.

研究分野：植物病理学

キーワード：青枯病 エフェクター 抵抗性 宿主域

### 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性の植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* は、ナス科作物の最重要病害である青枯病の原因細菌である。本菌の宿主域は非常に広く、ナス、トマト、ジャガイモ、タバコ、バナナなどの経済作物を含む 100 種以上の植物を加害することが知られている。青枯病の防除には強度抵抗性を持つナス近縁野生種を台木として用いた接木栽培が効果的であるが、本菌は宿主域が変化しやすく、圃場で同じ台木を連続使用すると宿主域変異株が出現する(台木の非宿主抵抗性が打破される)ことが知られている。

植物と病原菌の相互作用において、植物は病原菌由来の PAMP や Avr エフェクターを感知して抵抗反応を誘導し、病原菌は III 型エフェクターをはじめとする病原因子で植物側の抵抗反応を抑制する。青枯病菌の宿主域変異株では、(1) 非宿主植物に認識される PAMP や Avr エフェクターの消失、(2) 植物の抵抗反応を抑え込む強力な病原因子の獲得、(3) 植物由来の抗菌物質から身を守る新規能力の獲得、などの変化がゲノムレベルで生じていると予想される。しかしながら、その分子的な実体は未知のままである。

### 2. 研究の目的

青枯病菌による抵抗性打破の分子機構を知ることは病原菌の宿主域変異機構を明らかにするのみならず、台木の青枯病抵抗性を理解することにもつながる。本研究は我が国の栽培現場において実際に生じた青枯病菌の宿主域拡大(台木抵抗性打破)現象について、その分子機構を明らかにすることを目的として行われた。

### 3. 研究の方法

我が国の青枯病菌の分類法の一つとして、4 つのナス属植物に対する病原性の違いから 5 つの菌群 (I~V) への分類が報告されている。筆者らが解析に用いている青枯病菌国内分離株 RS1000 は、この分類では II 菌群に属しており、ナス食用品種の千両二号には病原性を示すが、台木品種ヒラナス及びトルバム・ビガーには病原性を示さない。ヒラナスとトルバム・ビガーの抵抗性がどのようにして青枯病菌に打破されたかを明らかにする目的で、ヒラナスを発病させることができない II 菌群 (RS1000) とヒラナスを発病させることができる III 菌群及び IV 菌群を材料に用いて、まず最初に、Avr エフェクターの消失という観点から遺伝学的な比較解析を行った。研究代表者は、RS1000 株が植物感染時に 72 種ものエフェクターを宿主細胞内に注入していることを世界で初めて明らかにしている。III 菌群及び IV 菌群のエフェクターレパートリーが宿主域の拡大に伴い変化しているかどうかを PCR 検出で確認した。

### 4. 研究成果

日本国内で分離された青枯病菌の中から I 菌群 2 株、II 菌群 2 株 (うち 1 株は RS1000)、III 菌群 2 株及び IV 菌群 1 株を選んでゲノム DNA を抽出し、全エフェクター遺伝子について PCR 検出による分布調査を行った。その結果、ヒラナスに病原性を示す III 菌群及び IV 菌群に共通して 3 つのエフェクター遺伝子 (*rip10*, *rip36* 及び *popP1*) が検出されないことが明らかとなった。各エフェクター遺伝子を破壊した変異株をそれぞれヒラナスに接種し、病原性を確認した。その結果、*rip36* 変異株においてのみ顕著なヒラナスの発病・枯死が観察された。このことから、ヒラナスは Rip36 エフェクターを主要な Avr エフェクターとして認識し、抵抗性を誘導していると考えられた。ヒラナスと栽培ナスの交配後代の解析から、ヒラナスが I 菌群及び II 菌群に対して示す抵抗性は優性遺伝子に起因することが報告されているが、今回得られた結果はこの報告とよく一致し、ヒラナスには Rip36 を Avr 認識する優性の抵抗性 (*R*) 遺伝子が存在すると考えられる。

トルバム・ビガーは RS1000 株に対して過敏反応を伴う非常に強い抵抗反応を起動する(図 1)。興味深いことに、RS1002 (RS1000 のナリジキシン酸耐性変異株) 由来の *rip36* 変異株ではトルバム・ビガーに対する HR 誘導能が完全に消失した。このことから、ヒラナスのみならずトルバム・ビガーもまた Rip36 を主要な Avr エフェクターとして認識していることが明らかとなった。トルバム・ビガー本葉に青枯病菌を注入して植物内増殖を調べた結果、*rip36* 変異株は親株の RS1002 と比較して数百倍高い増殖能を示した。しかしながら、トルバム・ビガーに対して強い病原性を示す IV 菌群は *rip36* 変異株よりもさらに数百倍高い増殖能を示した。

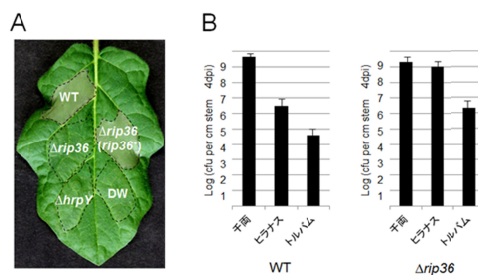


図 1. 青枯病菌変異株のトルバム・ビガーに対する HR 誘導能と植物内増殖能。トルバム・ビガー本葉における HR (A)。ナス食用品種 (千両二号)、ヒラナス及びトルバム・ビガーにおける RS1002 株 (WT) と *rip36* 変異株の増殖 (B)。*hrpY* 変異株はエフェクター注入能力を欠損したタイプ III 分泌系変異株。

*rip36* 変異株のトルバム・ピガーに対する病原性は不安定であり、接種条件に左右されたが、IV 群菌は安定してトルバム・ピガーを短期間で枯死させた。これらの結果から、トルバム・ピガーの青枯病抵抗性は複数因子で構成されること、Rip36 エフェクターの Avr 認識は中でも寄与が大きいことが明らかとなった。IV 群菌は、*rip36* 変異に加え、さらに別の未知の変異が生じることでトルバム・ピガーに対する強い病原性を獲得していると考えられる。このことは、IV 群菌は III 群菌が変化して生まれたことを強く示唆する。

本研究では、青枯病菌のエフェクターレパートリーの解明を契機に、これまで謎であった青枯病菌の台木抵抗性打破（宿主域拡大）メカニズムの解明を目指した。ヒラナスの抵抗性打破においては、青枯病菌の Rip36 エフェクターの消失が原因となっており、ヒラナスの青枯病抵抗性が Avr 認識によるものであることが明らかとなった。非親和性青枯病菌の増殖をある程度許すヒラナスにおいて、その抵抗性が優性の抵抗性 (*R*) 遺伝子に起因するらしいことは興味深い。一方、非親和性の青枯病菌に対して顕著な HR を誘導するトルバム・ピガーにおいても、その抵抗性の主要因は Rip36 の Avr 認識であった。トルバム・ピガーが持つ抵抗性は複数の抵抗性遺伝子によるものと推察され、短期間では打破されにくいと考えられるが、ヒラナスを侵す III 群菌が出現したことで、ヒラナスと共通する抵抗性の一部が早くから打破されていたことが抵抗性の早期打破につながったと推察される。

二つの異なるナス属植物（ヒラナス及びトルバム・ピガー）の青枯病抵抗性に Rip36 の Avr 認識が寄与していたことは、Rip36 を認識する抵抗性 (*R*) 遺伝子がナス属植物に広く分布することを示唆する。青枯病菌の Avr エフェクターはこれまでに 3 つ、ペチュニア及びタバコに認識される PopP1、シロイヌナズナに認識される PopP2、タバコに認識される AvrA が知られているが、Rip36 はナス属植物で見いだされた初めての Avr エフェクターである。栽培ナス品種が有する青枯病抵抗性の QTL 解析から、抵抗性の主要因となる優性遺伝子領域が見出されているが、この抵抗性遺伝子が Rip36 認識を担う抵抗性 (*R*) 遺伝子と一致するかどうかは興味深い。また、タルウマゴヤシにおいても、青枯病抵抗性の QTL 解析から抵抗性に寄与する優性遺伝子領域が見出されているが、この領域内には少なくとも 7 つの抵抗性 (*R*) 遺伝子がコードされている。栽培ナス品種やナス近縁種が有する青枯病抵抗性は複数遺伝子支配であることが報告されているが、その抵抗性のいくつかは Avr エフェクター認識によるものかもしれない。そのような場合、今回のエフェクターやエフェクター欠損株を検出ツールとして用いるエフェクター補助育種の手法は、抵抗

性 (*R*) 遺伝子の検出や特性評価に有効と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., Shiraiishi, T., Ichinose, Y., and Mukaihara, T. *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Mol. Plant Pathol.* 15: 297-303 (2014).

— 瀬 勇 規、田 口 富 美 子、向 原 隆 文  
「*Pseudomonas syringae* の病原性と病原因子」日植病報、第 80 巻特集号 97-103 頁(2014)

向原隆文 青枯病菌における宿主域拡大の分子機構. 第 26 回植物細菌病談話会論文集 26: 19-28 (2014)

Ichinose, Y., Taguchi, F., and Mukaihara, T. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 285-296 (2013).

〔学会発表〕(計 6 件)

向原隆文. 青枯病菌における宿主域拡大の分子機構. 第 26 回植物細菌病談話会、平成 26 年 10 月 9-10 日 (岡山)

向原隆文、畑中唯史、小田賢司. 宿主細胞内グルタチオンを標的とする青枯病菌 III 型エフェクターの同定. 平成 26 年度日本植物病理学会大会、平成 26 年 6 月 2-4 日 (北海道)

向原隆文、小田賢司. ナス科植物青枯病菌における宿主域拡大の分子機構. 第 14 回 RIBS バイオサイエンスシンポジウム、平成 26 年 11 月 14 日 (岡山)

向原隆文、畑中唯史、小田賢司. 真核細胞チオレドキシシンによる青枯病菌グルタチオン分解酵素エフェクターの活性化. 平成 27 年度日本植物病理学会大会、平成 27 年 3 月 28-31 日 (東京)

向原隆文. 青枯病菌の Hrp タイプ III 分泌系を介した植物感染機構. 第 33 回岡山植物病理セミナー、2013 年 5 月 18 日 (岡山)

Nahar, K., Taguchi, F., Yamamoto, M., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraiishi, T., Ichinose, Y., and Mukaihara, T. Type III secretion system effectors Rip36 of *Ralstonia solanacearum* and HopH1 of *Pseudomonas syringae* induce hypersensitive response in nonhost *Solanum torvum*. 平成 25 年度日本植物病理学会関西

部会、2013年9月26 - 27日(岡山)

〔図書〕(計0件)  
該当なし

〔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