

令和元年5月15日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14863

研究課題名（和文）分子標的剤を利用した病原細菌の三型分泌装置形成の制御機構の解明と新規農薬の開発

研究課題名（英文）Identification of natural products inhibiting formation of type III secretion system of bacterial pathogens

研究代表者

川崎 努 (Kawasaki, Tsutomu)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：90283936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：イネ白葉枯病菌などの病原細菌は、三型分泌装置によりエフェクターと総称される病原性因子を植物細胞内に分泌し、宿主の免疫応答を阻害することが知られている。そのため、エフェクターを分泌する三型分泌装置の形成を阻害する分子標的剤を見出すことができれば、極めて有効な病害防除技術として期待できる。本研究では、三型分泌装置の形成因子の遺伝子発現をモニターするスクリーニング系を構築し、放線菌が生産する代謝化合物の中から、三型分泌装置の形成を阻害する分子標的剤を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、古くから細菌病の農薬として利用されてきた銅剤などの使用が、環境的問題から制限されつつある。そのため、環境保全型の細菌病農薬の開発が望まれている。一方、多くの病原細菌は三型分泌装置により、病原性の根幹となるエフェクターを植物細胞内に分泌し、植物の免疫応答を抑制することで病気を拡大している。本研究で得られた放線菌由来の代謝物は、三型分泌装置の形成を抑制することが明らかとなり、細菌病農薬のシーズとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Bacterial pathogens deliver effector proteins into plant cells by type III secretion system. The effectors strongly suppress host immune responses as the virulence factors. Therefore, natural products that can inhibit formation of type III secretion system are useful for disease control. To screen such natural products from actinomycete secondary metabolites, we developed a system to monitor expression of the genes involved in formation of type III secretion system and found the candidate metabolites that can suppress the type III secretion system.

研究分野：植物保護

キーワード：植物免疫 エフェクター 三型分泌装置 分子標的剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、病原菌の感染を認識し、多様な免疫応答を誘導する。一方、病原菌は、植物の細胞内外にエフェクターと総称される分子を分泌し、エフェクターが植物の防御反応を抑制することで、感染を拡大する。*Xanthomonas* 属などの病原細菌は、三型分泌装置によりエフェクターを植物細胞内に分泌することが知られているが、病原細菌が植物体内への侵入を感知し、三型分泌装置を誘導する情報伝達機構については、あまり理解されていない。さらに、近年の多くの研究により、エフェクターが病原性において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。実際、白葉枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)の三型分泌装置を欠損した *xopX* 変異株では、エフェクターをイネ細胞内に分泌できないため、病原性を誘導できず、イネの葉の中で増殖できないことがわかった。同様な結果は、トマト斑葉細菌病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) など、他の病原菌においても得られている。このことから、エフェクターを分泌する三型分泌装置の形成を阻害する分子標的剤を見出すことができれば、極めて有効な病害防除技術として利用可能である。一方、近年、これまで世界中で利用されてきた銅剤などの細菌病に有効な農薬の使用が、環境問題により、制限されつつある。そのため、環境低負荷型の新たな細菌病農薬の開発が望まれている。もし、病原細菌の三型分泌装置の形成を阻害する農薬が開発できれば、それは、細菌自身を殺すことなく、病原性のみを抑制することが可能であるため、環境低負荷型の農薬として期待できる。

### 2. 研究の目的

病原菌は、植物の侵入に伴ってエフェクターを分泌し、植物の免疫応答を強く阻害することで感染を成立させている。多くの病原細菌においては、三型分泌装置を介してエフェクターが植物細胞に分泌されている。三型分泌装置の形成は、病原細菌が植物細胞内環境を認識することにより、誘導されていると考えられるが、その誘導機構はあまり理解されていない。本研究では、病原細菌による病原性の鍵となるエフェクターを分泌する三型分泌装置の形成を阻害する分子標的剤を見つけることで、環境低負荷型の農薬のシーズを見出すことを目的としている。さらに、分子標的剤のターゲット因子を同定することで、三型分泌装置を形成する制御機構も解明できる。そこで、イネ白葉枯病菌とトマト斑葉細菌病菌の三型分泌装置の形成因子の遺伝子発現をモニターできる実験系を構築し、放線菌ライブラリーから抽出した代謝物を用いて、三型分泌装置の形成を阻害する代謝物を生産する放線菌を同定する。さらに、同定した放線菌の代謝物を分画し、候補化合物を同定する。加えて、候補化合物を植物に処理することにより、病原菌の病原性を抑制できるかどうかを解析し、新規な農薬のためのリード化合物を同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Hrp* 遺伝子のプロモーター活性の測定

イネ白葉枯病菌とトマト斑葉細菌病菌の三型分泌装置の形成に関与する *HrcU* 遺伝子と *HrpL* 遺伝子のプロモーターを単離し、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に結合させたコンストラクトを作成し、それぞれの病原菌に導入した。得られた病原菌を NBY 培地で増殖させた後、*Hrp* 遺伝子の発現を誘導する MME 培地で 18 時間処理し、GUS の基質である 4-MUG を用いて、マイクロプレートリーダーで GUS 活性を測定した。GUS 活性は、それぞれの遺伝子のプロモーター活性を示し、三型分泌装置形成をモニターするために使用された。

#### (2) 菌数の測定

本研究では、菌の増殖に影響せず、病原性を抑制する分子標的剤の探索を目的としているため、GUS 活性を測定した菌を PSA 培地にプレーティングし、菌の数を計測することで、分子標的剤が抗菌活性をもつかどうかを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) イネ白葉枯病菌とトマト斑葉細菌病菌の三型分泌装置を形成する遺伝子の発現モニター系の構築

病原細菌の三型分泌装置は、*Hrp* 遺伝子群の発現によって形成される。*Hrp* 遺伝子を用いて、三型分泌装置の形成をモニターする実験系を構築するため、トマト斑葉細菌病菌の *HrpL* 遺伝子のプロモーターとイネ白葉枯病菌の *HrcU* 遺伝子のプロモーターを単離した。それらのプロモーターを、レポーターとして用いる  $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)遺伝子に連結し、*HrpLpro-GUS* 遺伝子と *HrcUpro-GUS* 遺伝子を構築した。それぞれの遺伝子を含むプラスミドを、トマト斑葉細菌病菌とイネ白葉枯病菌に導入し、三型分泌装置形成のモニター系として使用した。

#### (2) 分子標的剤のスクリーニング条件の決定

ハイスループットなスクリーニングを行うためには、高感度な実験系を構築する必要があった。そのため、最も高い GUS 活性が得られる基質の選択を行い、4-MUG に決定した。さらに、MME 培地を用いることで、菌が三型分泌装置形成を誘導し、顕著な GUS 活性が検出されることが明らかになった。さらに、96 穴あるいは 384 穴プレートを用いて、マイクロプレートリーダーで GUS 活性を測定できるハイスループットなスクリーニング系を構築した。

### (3) 三型分泌装置形成を阻害する分子標的剤の探索

上記のように、*HrcUpro-GUS* 遺伝子をもつプラスミドを導入した白葉枯病菌は、MME 培地において GUS を発現する。この培養系に、放線菌由来の代謝物を処理し、GUS 活性を抑制するが、菌の増殖を抑制しない代謝物を生産する放線菌のスクリーニングを行った。合計 358 種の放線菌から代謝物を抽出し、それらを処理

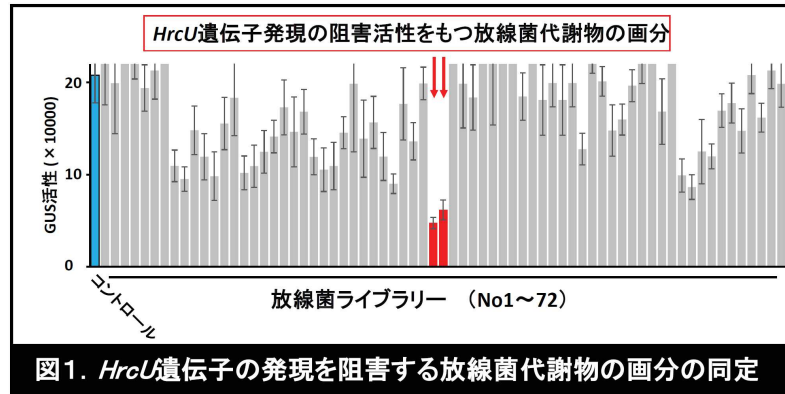


図1. *HrcU*遺伝子の発現を阻害する放線菌代謝物の画分の同定

し、GUS 活性を測定したところ、GUS 活性を 75%阻害する放線菌が 37 種、50%阻害する放線菌が 56 種得られた (図1)。GUS 活性を 75%阻害した 37 種の放線菌の代謝物について、菌の増殖に影響を与えているかどうかを解析したところ、そのうち 20 種は菌の増殖を抑制し、17 種は菌の増殖に影響を与えないがわかった。本研究では、抗菌性を示さず、病原性のみを抑制する分子標的剤の開発を目的としているため、菌の増殖を抑制しない 17 種の放線菌の代謝物について解析を進めた。

イネ白葉枯病菌に対して効果を示した 17 種の放線菌由来の代謝物が、種が異なるトマト斑葉細菌病菌にも有効であるかどうかを解析するために、*HrpLpro-GUS* 遺伝子をもつプラスミドを導入したトマト斑葉細菌病菌に処理し、GUS 活性の測定を行った。その結果、17 種の内、6 種は、トマト斑葉細菌病菌に対して、GUS 発現の抑制効果を示し、11 種は示さないことがわかった。このことから、6 種の放線菌由来の代謝物は、イネ白葉枯病菌とトマト斑葉細菌病菌の両方に効果をもつが、11 種はイネ白葉枯病菌にのみ効果をもつことがわかった。両方の病原細菌に効果を示した 6 種の放線菌の代謝物は、イネ白葉枯病菌とトマト斑葉細菌病菌に共通した制御因子に作用していると考えられ、広範囲の病原細菌に対して効果を示す可能性が示唆された。

イネ白葉枯病菌とトマト斑葉細菌病菌の両方に効果を示した 6 種の放線菌のうち、2 種について、それぞれの放線菌の代謝物を 60 個の画分に分画し、全ての画分に対して、イネ白葉枯病菌を用いて GUS 活性を測定した。その結果、それぞれの放線菌の 60 画分のうち、2 画分において、GUS 活性の抑制効果が検出された。それらについて、さらに分画と GUS 活性測定を進め、GUS 活性を抑制している合計 4 つの画分を見出した。そのうち、1 つの画分からは、GUS 活性を抑制する代謝物 A を同定することに成功した。残りの 3 つの画分について、解析を進めているが、現時点では、候補代謝物の特定に至っていない。

### (4) 白葉枯病菌の感染における候補代謝物の効果

(3)の解析によって得られた代謝物 A が、白葉枯病菌の病斑形成に効果を示すかどうかを調べた。イネに白葉枯病菌を剪葉接種する際に、同時に代謝物 A を処理し、病斑の伸展を解析した。その結果、無処理区に対して、代謝物 A を処理したものでは、顕著に病斑の伸展が抑制された。この結果は、代謝物 A が白葉枯病菌の三型分泌装置形成を抑制し、病原性が抑制されたことを示唆している。

### (5) 白葉枯病菌の感染様式の解析

イネ白葉枯病菌は、道管で増殖し、その結果、道管が詰まることによって葉が枯れると考えられている。しかし、実際に、イネ白葉枯病菌がどのように増殖しているかについては、あまり理解されていない。そこで、本研究で作成した、*HrcUpro-GUS* 遺伝子をもつイネ白葉枯病菌を用いて、感染様式を解析した。*HrcUpro-GUS* 遺伝子導入菌株を、剪葉接種法によりイネに接種し、経時的に葉をサンプリングした。サンプリングした葉を固定後、X-Gulc を用いて GUS 染色を行い、顕微鏡で観察した。その結果、葉の維管束に沿って、GUS 発現が検出された。このことは、白葉枯病菌が維管束で三型分泌装置の形成を誘導していることを示している。しかし、GUS 染色では、高解像度での解析は難しかった。そこで、*HrcU* プロモーターに蛍光タンパク質遺伝子を繋いだコンストラクトを作成した。今後、蛍光観察により、白葉枯病菌の感染様式を詳細に解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

① 山口公志, 山本剛大, 木村泉貴, 吉村智美, 川崎努, イネ白葉枯病菌エフェクター XopZ によ

- る核内標的因子を介した免疫抑制機構の解析, 日本植物病理学会 (2019)
- ② 山本剛大, 木村泉貴, 吉村智美, 山口公志, 津下誠治, 川崎努, イネ白葉枯病菌エフェクター XopZ による新規免疫抑制機構の解析, 日本植物生理学会 (2019)
  - ③ Yamaguchi K, Yamamoto G, Nomura S, Yoshimura S, and Kawasaki T, Identification of rice immune factors targeted by the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* effector. 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (2018)
  - ④ Yamaguchi K, Yamada K, Iwai M, Horiuchi N, Yoshimura S, Tsuge S, and Kawasaki T. Identification of a novel *Xanthomonas oryzae* effector to suppress rice immune response. 日本植物生理学会 (2018)
  - ⑤ 安藤駿丞, 大内俊和, 泉谷真帆, 山口公志, 吉村智美, 川崎努, イネ病原菌認識受容体 Xa1 による TAL エフェクターの認識機構の解明, 日本植物病理学会関西西部会 (2017)
  - ⑥ Kawasaki T. Pathogen recognition and intracellular immune signaling in plants. International symposium Current and Future Trends in Food and Agricultural Immunology. (2016)

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Kawasaki T. (2018) Pathogen recognition and immune signaling. Rice Genomics, Genetics and Breeding, Springer Nature, 361-374. 総ページ数 558
- ② 川崎努 (2016) 植物の病害防除機構, 植物の百科事典. 丸善, 総ページ数 802

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ [http://www.nara.kindai.ac.jp/laboratory/kawasaki\\_lab/index.html](http://www.nara.kindai.ac.jp/laboratory/kawasaki_lab/index.html)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 山口 公志

ローマ字氏名 : Koji Yamaguchi

※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。