

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Amol Dahal
審査委員	主査 大西 浩平 副査 小林 括平 副査 田淵 光昭 副査 木場 章範 副査 加藤伸一郎

論文名

Study on function of type III effectors in *Ralstonia solanacearum*
(青枯病菌における III 型エフェクターの機能に関する研究)

審査結果の要旨

青枯病菌は、トマトやナスなど 200 種類以上の植物に感染し青枯れ症状を引き起こす難防除植物病原細菌である。他のグラム陰性病原細菌と同様に、感染過程において III 型タンパク質分泌装置から分泌される III 型エフェクタータンパク質を宿主細胞に注入し、感染を成立させる。一方、宿主植物は注入されたエフェクターを無毒化するためのタンパク質を進化させ、病気から逃れようとする。こうしたいわゆるジグザグモデルの結果、植物病原細菌は数多くの III 型エフェクタータンパク質を保有するようになってきている。実際に青枯病菌においては 70 種類以上のエフェクターの存在が明らかとなっている。それぞれのエフェクターの機能を調べる方法にはいくつかあるが、本研究においては、エフェクター遺伝子と相互作用する植物タンパク質を、酵母による yeast two hybrid (Y2H) システムによってスクリーニングし、そこからエフェクターの機能を推測する手法をとった。

青枯病菌の持つエフェクターには、配列の相同性のからなるいわゆるファミリーエフェクターがいくつか知られている。そのうちのひとつが、RipG (Gala) エフェクターファミリーである。青枯病菌日本株 OE1-1 株には 7 種類の RipG エフェクターが存在している。RipG ファミリーは F-box 領域と LRR (Leucine-rich repeat) 領域を持つタンパク質である。RipG2 を除いて、LRR は C 末端側に配置されている。フランスのグループによるこれまでの研究により、RipG エフェクターは F-box 領域を介してシロイヌナズナ Skp1 (Suppressor of kinetochore protein 1) と結合することが示されている。植物内には多数の F-box タンパク質が存在しており、Skp1 の他に Cullin、Rbx1 と SCF タンパク質複合体であるユビキチンリガーゼを形成することで、特定のタンパク質の認識とその分解に関与している。

本研究では RipG ファミリーエフェクターと相互作用するタバコタンパク質を、Y2H システムを用いて探索した。まず、2 種類のタバコ植物 *Nicotiana tabacum* と *Nicotiana benthamiana* の葉から RNA を抽出 cDNA に逆転写したのち、酵母の GAL4-AD 領域との融合タンパク質となるように prey ライブラリーを構築した。一方、7 種類の RipG 遺伝子を GAL4-BD 領域と融合するように bait プラスミドも構築した。両者を酵母細胞内で

共存させることで、RipG エフェクターと相互作用するタバコタンパク質を探索した。その結果、RipG3 及び RiPG4 と相互作用するタバコタンパク質は得られなかったが、それ以外の 5 種類の RipG タンパク質と相互作用するタバコタンパク質が複数得られた。その中には、タバコ Skp1 も含まれていた。

単離された陽性クローンの配列を元に *N. tabacum* と *N. benthamiana* のそれぞれから 2 種類、合計 4 種類の *skp1*cDNA の全長を増幅し GAL4-AD との融合遺伝子を構築した。いずれの Skp1 も RipG1、RipG2、RipG5、RipG6、RipG7 と相互作用することが Y2H システムによって明らかとなった。RipG2 と RipG7 の F-box 領域を欠失させると、Skp1 との相互作用が確認されなかったことから、シロイヌナズナの場合と同様にタバコ Skp1 と F-box を介して結合していることが証明された。一方、Skp1 以外のタバコタンパク質は多様で、共通した性質は一見確認できなかったが、詳細に解析すると、細胞質で合成された後、葉緑体に輸送される核支配の葉緑体タンパク質が大部分を占めていることが明らかとなった。

スクリーニングされた葉緑体タンパク質の中から chlorophyll a-b binding protein 13 (*Nbcab13*)、chaperonin-like RbcX protein (*NbrbcX*)、ribulose biphosphate carboxylase small chain (*NbrbcS*) の 3 種類をコードする cDNA の全長と GAL4-AD との融合遺伝子を構築し、以降の解析に用いた。いずれの葉緑体タンパク質も RipG2 と RipG7 とのみ強く相互作用することが確認された。RipG2 の F-box 欠失体は葉緑体タンパク質 NbCab13 と相互作用したことから、Skp1 とは結合部位を共有しないことが明らかとなった。同様に、RipG7 の F-box 欠失体は 3 種類の葉緑体タンパク質 NbCab13、NbRbcX、NbRbcS いずれとも相互作用したことから、Skp1 とは結合部位を共有しなかった。そこで、RipG7 の N 末端部分もしくは C 末端の LRR 領域を欠失させた誘導体を構築し葉緑体タンパク質との結合を調べた。なお、Skp1 はいずれの欠失体とも相互作用した。NbRbcX は LRR 欠失体との相互作用を失ったことから、LRR が結合部位であることが判明した。一方、NbCab13 と NbRbcS の LRR 欠失体は結合能を保持していたのに対し、N 末端欠失体との結合能を喪失した。これらのことは、葉緑体タンパク質によって RipG7 との結合部位が異なっていることを示している。

これまでに F-box タンパク質である RipG7 は植物の Skp1 と結合し宿主のユビキチン系をかく乱すると考えられてきたが、本研究により、ユビキチン系によって葉緑体タンパク質が実際に分解されるターゲットである可能性が始めて示された。

青枯病菌の 2 種類のエフェクター遺伝子 *popP1* と *avrA* はタバコにおける非病原性遺伝子であることが示されている。日本株におけるこれら 2 種類の非病原性遺伝子について解析を行った。日本株にはタバコに対して病原性を示す株と HR を誘導する株が存在している。HR を誘導する 4 株 (8107, MAFF211471, MAFF211496, MAFF301520) と病原性を示す 1 株 (OE1-1) を用いた。8107 と MAFF211471 は *popP1* 遺伝子を持つが、他の株はゲノム上に *popP1* を欠いている。タバコに病原性を示す株 OE1-1 から *avrA* を欠失させたところ、植物体内での増殖能は増加したものの、病原力は野生株と同等であった。しかしながら、8107 株の *popP1* 遺伝子を導入したところ、著しい病原力の低下が確認された。また増殖能が著しく低下した。このことは OE1-1 株においては PopP1 が非病原性因子として働くことを強く示唆している。

一方、HR 誘導株から *avrA* 遺伝子を欠失させた変異株を構築しタバコ葉に接種したところ、程度の差はあるものの、いずれも HR が誘導される時間が遅くなった。しかしながら、接種されたタバコが枯死することはなかった。これは HR 誘導株である GMI1000 株において *popP1* と *avrA* の非病原性遺伝子を両方欠失させると病原性を示すようになるという報告と異なる結果である。日本株においては、更に別のエフェクターがタバコにおける HR 誘導に関与している可能性を示唆している。

本論文に関する公開審査会は平成 30 年 2 月 3 日、愛媛大学農学部で開催され、申請者の論文発表と適切な質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査会で本論文の内容を慎重に審議し、審査委員全員一致して博士 (学術) の学位を授与するに値するものと判定した。