

## 学位論文要旨 Dissertation Abstract

氏名： 藤原 祥子  
Name

学位論文題目： 宿主グルタチオンを標的とした植物病原菌エフェクターの  
Title of Dissertation 機能解析

学位論文要旨：  
Dissertation Abstract

ヒトや植物に感染する多くの病原菌は、III型分泌装置を介して、エフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞へ注入する。エフェクターは宿主の防御応答に抵抗するための武器であり、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うえで重要である。我々は、酵母発現系を用いて宿主チオレドキシン(Trx)を活性化因子として宿主グルタチオン(GSH)を分解する植物病原菌エフェクターの機能解析を行った。

### 第一章 *Ralstonia solanacearum*エフェクターRipAYの機能解析

青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)のエフェクター36個を酵母で過剰発現させたところ、8個のエフェクターが酵母に増殖阻害を引き起こした。このうち、RipAY/RSp1022はすべての生物に保存されたChaCドメインを有していた。近年、酵母及びヒトのChaCタンパク質が細胞内レドックス恒常性維持に必須な役割を担うGSHを特異的に分解する $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)活性を有することが報告され<sup>1)</sup>、RipAYが宿主GSHを標的とすることが考えられた。そこで、RipAYを発現させた酵母の細胞内GSH濃度を測定したところ、コントロールと比較して約30%にまでGSH濃度の低下が見られた<sup>2)</sup>。また、推定活性中心を変異させた変異体(RipAY<sup>E216Q</sup>)を酵母で発現させたところ、酵母の増殖阻害は見られず、酵母細胞内のGSH濃度の有意な減少が見られなかった。このことから、RipAYは酵母細胞内でGGCT活性を有し、酵母増殖阻害はRipAYの活性に依存すると示唆された。しかし、大腸菌で発現させた組換えRipAYは、全くGGCT活性を示さなかった。そこで、大腸菌から精製した不活性型RipAYに酵母抽出液を添加して活性を測定したところ、有意なGGCT活性が検出されたことから、RipAYは何らかの真核生物性因子によってGGCT活性を獲得していることが考えられた<sup>2)</sup>。

そこで酵母タンパク質抽出液から、RipAYの活性化を指標として各種クロマトグラフィーにより活性化因子を単離して質量分析を行ったところ、Trx1/Trx2が活

性化因子として同定された。大腸菌から精製した組換え酵母Trx(*ScTrx1*) とシロイヌナズナTrx(*AtTrx-h2*, *-h3*, *-h5*)は、試験管内でRipAYを濃度依存的に活性化したが、青枯病菌Trx(*RsTrxA*)はRipAYを活性化しなかったことから、RipAYは真核生物Trx特異的にGGCT活性を獲得することが明らかになった<sup>2)</sup>。

RipAY及び*AtTrx-h5*の各種変異体を用いた解析により、RipAYとTrxの相互作用がS-S結合を介したものではないことが示唆された。また、RipAYはN末端、C末端側を介してTrxと相互作用することが明らかになった<sup>3)</sup>。さらに、精製した複合体を用いた解析から、RipAYとTrxは1:2の割合で結合していることが示された<sup>3)</sup>。一方、酵母内在性のChaCタンパク質である*ScGcg1*は、Trx非存在下でもGGCT活性を示すが、*ScTrx1*の添加によって活性が増加することが示された<sup>3)</sup>。このことから、ChaCタンパク質はTrxを認識することで細胞内レドックス恒常性を維持する役割を担っている可能性が示唆された。

## 第二章 *Acidovorax citrulli*推定エフェクターAave\_4606の機能解析

スイカ果実汚斑細菌病菌(*Acidovorax citrulli*)由来の機能未知タンパク質Aave\_4606は、系統樹解析によりRipAYと同じグループに分類されたことから、RipAYと同様に真核生物TrxによってGGCT活性を獲得することが予測された。しかしながら、Aave\_4606は酵母で過剰発現させても増殖阻害は引き起こさなかった。そこで、組換え*ScTrx1*、*AtTrx-h1*, *-h2*, *-h3*, *-h5*またはスイカTrx(*CITrx*)の存在下で組換えAave\_4606タンパク質のGGCT活性を測定したところ、RipAYと異なり、Aave\_4606は*AtTrx-h1*, *-h3*, *-h5*と*CITrx*によってGGCT活性を示し、*ScTrx1*、*AtTrx-h2*では活性化しなかった。さらに、様々な植物抽出液によるAave\_4606の活性化を調べたところ、Aave\_4606はスイカとナス科植物の抽出液の添加によってのみ活性を示した。以上から、Aave\_4606は宿主由来Trxを特異的に認識しており、エフェクターの特異的な活性化が病原菌の宿主域の決定に関与していることが示唆された。

- 1) Kumar, *et al.* *EMBO reports* (2012) **13**: 1095-1101.
- 2) Fujiwara, *et al.*, *J Biol Chem* (2016) **291**: 6813-6830.
- 3) Fujiwara, *et al.*, *Biochem Biophys Res Com*, in press.