

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18651

研究課題名(和文)病原菌エフェクターの植物免疫抑制機構および認識回避機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms by which pathogen effectors suppress plant immunity and evade recognition

研究代表者

浅井 秀太 (Asai, Shuta)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：30723580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を植物細胞内に注入し抵抗反応を抑制することで、感染を成立させている。一方、抵抗性を示す植物は、抵抗性(R)遺伝子産物を用いてエフェクターを認識し、防御応答を誘導する。

本研究により、シロイヌナズナのR遺伝子RPP4により認識されるべと病菌エフェクターAvrRPP4を同定すると共に、異なるべと病菌分離株由来のAvrRPP4アレルの解析により、宿主細胞内での局在変化、または感染時の発現抑制を通して、RPP4による認識を回避している機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pathogens secrete virulent proteins, termed effectors, that are delivered into plant cells, resulting in establishment of infection. To detect pathogen effectors, plants have evolved receptors called Resistance (R) proteins, resulting in resistance to pathogens.

This study uncovered a downy mildew effector, AvrRPP4, recognized by Arabidopsis R gene RPP4, and that its unrecognised alleles evade recognition by polymorphism of expression and subcellular localization.

研究分野：植物病理学

キーワード：エフェクター 抵抗性遺伝子 植物・病原菌相互作用

1. 研究開始当初の背景

植物と病原菌は、自身の存続をかけた攻防により共進化してきた。植物病原菌はエフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を植物細胞内に注入し、植物の防御反応を抑制することで、感染に成功する。一方、抵抗性を示す植物は、抵抗性 (*R*) 遺伝子産物を用いてエフェクターを認識し、過敏感反応 (hyper sensitive response: HR) と呼ばれる細胞死を伴う強力な防御応答を誘導する。つまり、*R* 遺伝子により認識されるエフェクターは本来強力に植物の抵抗反応を抑制する能力を有していること、およびエフェクターは認識を避けるために進化してきたことが考えられる。

Hyaloperonospora arabidopsidis (Hpa) は、シロイヌナズナにべと病を引き起こす絶対寄生の卵菌であり、その全ゲノム配列はすでに明らかとされている (Science, 330:1549-51, 2010)。また、7つの異なる Hpa 分離株のゲノム配列もすでに決定されており、それら分離株間の比較ゲノミクスが可能となっている (未発表)。シロイヌナズナの Col-0 遺伝子型は、*R* 遺伝子 *RPP4* により Hpa の分離株 Emoy2 を認識することが知られているが、認識されるエフェクター (AvrRPP4) は同定されていなかった。以前、研究代表者は非病原性株 Emoy2 (*RPP4* による認識) および病原性株 Waco9 (*RPP4* による認識回避) を接種したシロイヌナズナ (Col-0) において RNA シークエンシングによるトランスクリプトーム解析を行い、感染時のエフェクターの発現パターンを明らかにしていた (PLoS Pathog. 10(10):e1004443, 2014)。そこで、ゲノム配列を決定した7つの Hpa 分離株間の比較ゲノミクス解析、および Emoy2 と Waco9 間の比較トランスクリプトミクス解析により、AvrRPP4 候補を選抜した。ベンサミアナタバコ植物においてアグロバクテリウムを介して *RPP4* と候補エフェクター (Candidates) を一過的に共発現させたところ、*RPP4* と Candidate 1 (AvrRPP4) を共発現させた部位において HR 細胞死が観察された。以上の研究により、シロイヌナズナの *R* 遺伝子 *RPP4* により認識される Hpa エフェクター AvrRPP4 を同定していた。また、AvrRPP4 は宿主細胞内で細胞質と核内、特に核小体に局在すること、および核内に局在することが *RPP4* による認識に必要であることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

上述の通り、AvrRPP4 は対応する *R* 遺伝子 *RPP4* が存在しない場合、強力に植物免疫を抑制する能力を有していることが考えられる。また、*RPP4* による認識を回避している Hpa 分離株由来の AvrRPP4 アレルが、植物との共進化の過程でどのように認識を回避するよう

に進化したのかを理解することは、広範囲かつ永続的な病害防除を目指す上で非常に重要である。そこで本研究では、新規の病害防除法の開発を目指し、AvrRPP4 が標的とする宿主側の因子を同定・解析することにより、AvrRPP4 の“植物免疫抑制機構”、ならびに“認識回避機構”の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) AvrRPP4 の認識回避機構の解明

AvrRPP4 (Emoy2 由来)に加えて、シロイヌナズナと Hpa の相互作用において RPP4 により認識されない Hpa 分離株 (Waco9, Cala2, Emco5, Maks9, Hind2) 由来の AvrRPP4 アレルについて生化学的な解析を行うことにより、AvrRPP4 の認識回避機構を解明する。

(2) AvrRPP4 の植物免疫抑制機構の解明

酵母 2 ハイブリッド法、および免疫沈降・質量分析法により AvrRPP4 の宿主相互作用因子 (標的タンパク質) を同定する。同定した宿主相互作用因子の過剰発現株・欠損変異株、および AvrRPP4 過剰発現株において、エリクターにより誘導される抵抗反応、および病害抵抗性の評価を行うと共に、トランスクリプトーム解析を行うことで、AvrRPP4 が標的とする植物免疫機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) AvrRPP4 の認識回避機構の解明

シロイヌナズナと Hpa の相互作用において RPP4 により認識されない Hpa 分離株 (Waco9, Cala2, Emco5, Maks9, Hind2) 由来の AvrRPP4 アレルをクローニングし、ベンサミアナタバコにおいて *RPP4* と一過的に共発現させたところ、*RPP4* と Waco9/Cala2 アレル、および Emco5/Maks9 アレルを共発現させた部位において HR 細胞死が観察される一方、Hind2 アレル (AvrRPP4^{Hind2}) と共発現させた部位では HR 細胞死が観察されなかった。興味深いことに、AvrRPP4^{Hind2} は核小体内に局在する割合が顕著に減少していた。上述の通り、AvrRPP4 の核局在が *RPP4* による認識に必要であることから、AvrRPP4^{Hind2} は宿主細胞内での局在を変化させることで *RPP4* による認識を回避している可能性が考えられた。そこで、核移行シグナル配列 (NLS) を付加した AvrRPP4^{Hind2} コンストラクト (NLS-AvrRPP4^{Hind2}) を作製し、ベンサミアナタバコにおいて *RPP4* と共発現させたところ HR 細胞死を誘導した。また、Emoy2 アレル (AvrRPP4) と Hind2 アレル (AvrRPP4^{Hind2}) の配列を比較したところ、AvrRPP4^{Hind2} では AvrRPP4 が持つ推定の核局在シグナル配列 (NLS) 内に一カ所の一塩基多型が見つかった。そこで、AvrRPP4 および

AvrRPP4^{Hind2}由来の推定NLSにGFPを結合したコンストラクト(GFP-NLS^{Emoy2}、GFP-NLS^{Hind2})を作製したところ、GFP-NLS^{Emoy2}では核小体内での顕著なGFP蛍光が観察されたのに対して、GFP-NLS^{Hind2}では観察されなかった。以上の結果より、AvrRPP4^{Hind2}は宿主細胞内局在を変化させる遺伝子変異によりRPP4による認識を回避していることを明らかにした。

続いて、RPP4による認識を回避しているHind2以外のHpa分離株の認識回避機構について調べたところ、少なくとも分離株Waco9は感染時にAvrRPP4の遺伝子発現を抑制することでRPP4による認識を回避していることを明らかにした。現在、RPP4による認識を回避している分離株と認識される分離株間の交配により得られたラインにおいてAvrRPP4の遺伝子型と表現型(RPP4による認識の有無)を調べており、これまでの結果と合わせて論文を投稿する予定である。

(2) AvrRPP4の植物免疫抑制機構の解明

薬剤誘導型のプロモーターにAvrRPP4を連結したコンストラクトをrpp4欠損シロイヌナズナ変異体に導入した形質転換体を作製した。AvrRPP4が植物免疫機構を標的としている場合、作製した形質転換体は薬剤によるAvrRPP4発現誘導後、病原菌(特にHpa)に対する罹病性が増加すると予想された。しかし、形質転換体は、逆にHpaに対する抵抗性が増加し、防御応答マーカー遺伝子であるPRIの発現レベルも増加していた。この結果より、AvrRPP4はRPP4以外のR遺伝子にも認識される可能性が示唆された。同時に、この形質転換体を使用することによるAvrRPP4の“植物免疫抑制機構”の解析が難しくなり、現在その解析はストップしている。

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)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Hillmer R.A., Tsuda K., Rallapalli G., Asai S., Truman W., Papke M.D., Sakakibara H., Jones J.D.G., Myers C.L. and Katagiri F. “The highly buffered Arabidopsis immune signaling network conceals the functions of its components” PLoS Genetics 査読有 13(5): e1006639, 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006639>
- ② Prince D.C., Rallapalli G., Xu D., Schoonbeek H.-J., Cevik V., Asai S., Kemen E., Cruz-Mireles N., Kemen A., Belhaj K., Schornack S., Kamoun S., Holub E.B., Halkier B.A. and Jones J.D.G. “Albugo-imposed changes to tryptophan-derived antimicrobial

metabolite biosynthesis may contribute to suppression of non-host resistance to *Phytophthora infestans* in *Arabidopsis thaliana*” BMC Biology 査読有 15:20, 2017.

DOI:10.1186/s12915-017-0360-z

- ③ 浅井秀太 “ゲノミクスおよびトランスクリプトミクスによる宿主-病原菌相互作用機構の解析” 感染生理談話会の50年～古きを温ねて、新しきを知る～, 土佐幸雄・中屋敷均・池田健一・中馬いづみ・吉田健太郎編, 日本植物病理学会, 東京 51:115-122, 2016.
- ④ Yoshioka H., Adachi H., Nakano T., Miyagawa N., Asai S., Ishihama N., and Yoshioka M., “Hierarchical regulation of NADPH oxidase by protein kinases in plant immunity” Physiological and Molecular Plant Pathology 査読有 95, 20-16, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.03.004>
- ⑤ Asai S. and Shirasu K., “Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors” Current Opinion in Plant Biology 査読有 28:1-8, 2015.
DOI:10.1016/j.pbi.2015.08.008.
- ⑥ Asai S., Shirasu K. and Jones J.D.G., “*Hyaloperonospora arabidopsidis* (downy mildew) infection assay in Arabidopsis” Bio-protocol 査読有 5(20): e1627, 2015.
<http://bio-protocol.org/e1627>
- ⑦ 吉岡博文・安達広明・石濱伸明・中野孝明・白石佑太郎・宮川典子・野村裕也・吉岡美樹・浅井秀太 “リン酸化反応が制御するROSバーストの分子機構” 日本植物病理学会報 81:1-8, 2015.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/130005129474>

[学会発表] (計11件)

- ① 浅井秀太 “Subtilisin-like proteaseは植物病原細菌に対する抵抗性を正に制御する” 平成29年度日本植物病理学会大会、2017年4月27日、アイーナ・いわて県民情報交流センター(岩手県・盛岡市)
- ② 浅井秀太 “A downy mildew effector evades recognition by polymorphism of expression and subcellular localization” 29th Fungal Genetics Conference, 2017年3月16日、Pacific Grove, California (USA)
- ③ 浅井秀太 “持続的な植物病害防除技術開発に向けた植物・病原菌間相互作用機構の解明” 第2回農学手先の会、2016年11月11日、雄琴温泉 湯の宿 木もれび(滋賀県・大津市)

- ④ 浅井秀太 “抵抗性遺伝子 RPP4 により認識されるべと病菌エフェクターの遺伝子型・表現型の非相関” 平成 28 年度日本植物病理学会関東部会、2016 年 9 月 30 日、横浜国立大学教育文化ホール（神奈川県・横浜市）
- ⑤ 浅井秀太 “ゲノミクスおよびトランスクリプトミクスによる宿主-病原菌相互作用機構の解析” 平成 28 年度植物感染生理談話会、2016 年 8 月 12 日、シーバル須磨（兵庫県・神戸市）
- ⑥ 浅井秀太 “A downy mildew effector evades recognition by polymorphism of expression and subcellular localization” XVII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions、2016 年 7 月 21 日、Portland, Oregon (USA)
- ⑦ 浅井秀太 “*Pto* DC3000 *avrRpt2* に抵抗性を示す *dde2/ein2/pad4/sid2* の復帰突然変異体の同定” 平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 22 日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）
- ⑧ 浅井秀太 “Screening for and characterization of revertant *dde2/ein2/pad4/sid2*-quadruple mutants showing resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrRpt2*” 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18 日、岩手大学（岩手県・盛岡市）
- ⑨ 浅井秀太 “べと病菌エフェクター ATR4 は宿主細胞内局在変化により抵抗性遺伝子 RPP4 による認識を回避する” 平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、2015 年 9 月 11 日、宇都宮大学（栃木県・宇都宮市）
- ⑩ 浅井秀太 “抵抗性遺伝子 RPP4 により認識されるべと病菌エフェクター ATR4 の同定および認識回避機構” 平成 27 年度植物感染生理談話会、2015 年 8 月 24 日、道後温泉メルパルク松山（愛媛県・松山市）
- ⑪ 浅井秀太 “Comparative genomics and transcriptomics reveal ATR4, a downy mildew effector that evades recognition by polymorphism of expression and localization”、the 4th International Conference on Biotic Plant Interactions、2015 年 8 月 2 日、南京市（中国）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 浅井秀太・白須賢 “植物と病原微生物の相互作用と作物保護” 難培養微生物研究の最新技術 III -微生物の生き様に迫り課題解決へ-、シーエムシー出版刊、125-134, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://plantimmunity.riken.jp/index.ja.html>

[html](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 秀太 (ASAI, Shuta)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：30723580