

令和元年5月20日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07618

研究課題名(和文)植物病原糸状菌付着器分泌型エフェクターの病原性機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of virulence functions of filamentous pathogen-secreting effectors

研究代表者

八丈野 孝 (Yaeno, Takashi)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10404063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原糸状菌が分泌するエフェクターは、宿主植物の細胞内へ侵入して免疫反応を抑制するが、病原性機能の分子メカニズムはまだよくわかっていない。本研究において、オオムギうどんこ病菌の付着器発芽管に含まれるタンパク質を網羅的に質量分析して多数同定したエフェクター候補タンパク質の中からAPEC1に焦点をあて、それがAVRエフェクターであるかを明らかにするとともに、宿主細胞内局在及びそれに寄与するアミノ酸配列の同定、さらには病原性機能を解析するためのAPEC1過剰発現シロイヌナズナ形質転換体の作製、共免疫沈降法による相互作用タンパク質の単離と同定を行い、病原性機能の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は病原菌の分子パターンを認識したり、抵抗性を持つ植物では抵抗性タンパク質がエフェクターを認識することにより、感染行動を停止させる。近年、コムギ黒さび病菌の新たなレースUg99がアフリカ大陸で出現し、今まで抵抗性であったコムギに感染するようになって西アジアまで拡散して作物病害パンデミックとして問題となっている。それに加え、本来イネに感染するいもち病菌がコムギにも感染するようにホストジャンプした報告も出始め、植物病原糸状菌の感染メカニズムの全容解明が急務となっている。本研究で得られた知見は、これら病原菌に共通する感染戦略を理解する上で多大なる貢献となり得るものである。

研究成果の概要(英文)：Effectors secreted from filamentous pathogens enter host plant cells to suppress the immune responses. However, the molecular mechanisms of the virulence functions are not yet well understood. In this study, we analyzed the proteins contained in the appressorial germ tubes of barley powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) with mass spectrometry and found a number of appressorial effector candidate (APEC) proteins. Among them, we focused on APEC1 and analyzed the possibility of AVR effector, the host cell localization, and the virulence function. Finally, we were able to find a peroxisome-localized protein as a target of APEC1.

研究分野：植物病理学

キーワード：うどんこ病菌 エフェクター 活性酸素 ペルオキシソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物病原系状菌が分泌するエフェクターは、植物の細胞内へ侵入して免疫反応を抑制するが、病原性機能の分子メカニズムはまだよくわかっていない。これまでに、オオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) をムギ類作物におけるエフェクター研究のモデル病原菌と捉えてプロテオーム解析を行い、単離した付着器分泌型エフェクター候補の中で APEC1 が病原性機能を持つ可能性があることを見出していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、APEC1 が新規の AVR エフェクターであるかを明らかにするとともに、AVR エフェクターであるならば R タンパク質による認識機構、あるいはその病原性機能を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) APEC1 は AVR エフェクターか？

APEC1 が AVR エフェクターとして HR 細胞死を引き起こすかどうか調べる際、通常では安定形質転換体を作製するなどして解析すべきであるが、形質転換可能なオオムギ品種が Golden Promise のみに限られており、供試するオオムギうどんこ病菌のレースが Golden Promise の持つ R 遺伝子 Mla8 が認識し得る AVR を持つため、技術的に本実験には適さない。そのため、パーティクルガンによる一過的発現系を用いた。各抵抗性遺伝子を持つ品種に GFP 及び APEC1 遺伝子を導入し、HR 細胞死により GFP 蛍光が消失し得る品種があるかを解析した。

#### (2) APEC1 の病原性機能の解析

APEC1 が病原性機能を持つか明らかにするために、パーティクルガンにより APEC1 をオオムギ細胞へ導入した後に非適応型菌であるエンドウうどんこ病菌を接種して侵入できるようになるかどうか解析した。また、シロイヌナズナに APEC1 を高発現させ、同様にエンドウうどんこ病菌が侵入できるようになるか調べた。

#### (3) APEC1 の宿主細胞内局在解析

APEC1 が病原性機能を持つことから、宿主細胞内の免疫応答をかく乱すると考えられる。そのため、宿主細胞内のどこに局在するのか調べるために APEC1-GFP をオルガネラマーカールとともにパーティクルガンで導入し、共焦点顕微鏡を用いて局在解析を行った。また、局在に必要なとされるアミノ酸配列を同定するために削り込み解析を行った。

#### (4) APEC1 の標的宿主タンパク質の探索

APEC1 の病原性機能の分子メカニズムを解明するために、標的とする宿主タンパク質の探索を行った。APEC1-GFP を発現させたベンサムアナ葉からタンパク質を抽出し、共免疫沈降法により相互作用するタンパク質を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) APEC1 は AVR エフェクターではない可能性が高い

マックスプランク研究所との共同研究で同定した AVRa1 をポジティブコントロールとして、AVRa1 と GFP 遺伝子を Mla1 を持つ品種に導入すると GFP 蛍光が減少することから、AVRa1 の認識により HR 細胞死が引き起こされ、GFP 発現細胞が死んだために蛍光が消失したと考えられる。この実験系を用い、9 アリルの *Mla*、*Mik1*、*Mlg*、*Mlp* を持つ品種において APEC1 を発現させても GFP 蛍光の減少は見られなかった。このことから、少なくとも試験した抵抗性タンパク質については APEC1 は認識されることがわかった。

#### (2) APEC1 は病原性機能を持つ

APEC1 を導入したオオムギ細胞においてはエンドウうどんこ病菌が侵入できるようになることから侵入抵抗性を抑制する機能を持つことがわかった。またさらに、シロイヌナズナに過剰発現させると顕著な成育阻害及びクロロシスを引き起こすことから、発生初期から発現させると葉細胞において何らかの異常を引き起こすことが明らかとなった。

#### (3) APEC1 の宿主細胞内局在解析

APEC1-GFP をオオムギ及びベンサムアナで発現させるとペルオキシソームに局在することが明らかとなった。また削り込み実験により C 末端の数アミノ酸が局在に必要なことがわかった。

#### (4) APEC1 の標的宿主タンパク質の探索

APEC1-GFP と相互作用するタンパク質を共免疫沈降法と質量分析により同定したところ、ペルオキシソームに局在するタンパク質であることがわかった。そのタンパク質に異常があるとクロロシスを起こすと考えられた。

以上の結果より、APEC1 は宿主のペルオキシソームタンパク質を標的とし、免疫応答をかく乱する病原性機能を持つことが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Ali, M. E., Ishii, Y., Taniguchi, J., Waliullah, S., Kobayashi, K., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M. (2018) Conferring virus resistance in tomato by independent RNA silencing of three tomato homologs of *Arabidopsis TOM1*. Arch. Virol. 163:1357-1362.

Wahara, M., Inoue, C., Kohguchi, T., Sugai, K., Kobayashi, K., Nishiguchi, M., Yamaoka, N., Yaeno, T. (2017) Improved method for in situ biolistic transformation to analyze barley-powdery mildew interactions. J. Gen. Plant Pathol. 83(3):140-146.

Bhor, S. A., Tateda, C., Mochizuki, T., Sekine, K.-T., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Kobayashi, K. (2017) Inducible transgenic tobacco system to study the mechanisms underlying chlorosis mediated by the silencing of chloroplast heat shock protein 90. VirusDisease 28 (1): 81-92.

Bhor, S. A., Tateda, C., Mochizuki, T., Sekine, K.-T., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Kobayashi, K. (2017) Inducible expression of magnesium protoporphyrin chelatase subunit I (CHL1)-amiRNA provides insights into cucumber mosaic virus Y satellite RNA-induced chlorosis symptoms. VirusDisease 28 (1): 69-80.

Lu, X., Kracher, B., Saur, I. M., Bauer, S., Ellwood, S. R., Wise, R., Yaeno, T., Maekawa, T., Schulze-Lefert, P. (2016) Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery mildew pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(42):E6486-E6495.

Akhter, M. S., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M. and Kobayashi, K. (2016) Hammer blot-mediated RNA extraction: an inexpensive, labor-saving method to extract RNA for plant virus detection. J. Gen. Plant Pathol. 82(5):268-272.

Akhter, M. S., Bhor, S. A., Hlalele, N., Nao, M., Sekine, K. T., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Gubba, A. and Kobayashi, K. (2016) Review of Beet pseudoyellows virus genome structure built the consensus genome organization of cucumber strains and highlighted the unique feature of strawberry strain. Virus Genes in press.

Ali, M. E., Waliullah, S., Kobayashi, K., Yaeno, T., Yamaoka, N. and Nishiguchi, M. (2016) Transmission of RNA silencing signal through grafting confers virus resistance from transgenically silenced tobacco rootstocks to non-transgenic tomato and tobacco scions. J. Plant Biochem. Biotech. 25(3):245-252.

Bhor, S. A., Akhter, M. S., Yaeno, T., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., Kaido, M. and Kobayashi, K. (2016) Simple and Quantitative Detection of Apple latent spherical virus Vector by a Spot Hybridization. Intl J. Modern Botany 6(2):31-36.

### 〔学会発表〕(計 26 件)

岩井さくら・長野眞依・清水茜・上原由紀子・小林括平・山岡直人・持田恵一・八丈野孝，ブラキボディウムを用いたオオムギうどんこ病菌の宿主特異性の解析，平成 31 年度日本植物病理学会大会，つくば市，2019 年 3 月 18 - 20 日

長野眞依・清水伸一・山岡直人・小林括平・八丈野孝，新たな 2 種の *Diaporthe* sp. によるカンキツ黒点病 (病原追加)，平成 31 年度日本植物病理学会大会，つくば市，2019 年 3 月 18 - 20 日

清水茜・吉田健太郎・小林括平・山岡直人・八丈野孝，レーザーインジェクション技術による single-cell エフェクター発現法の開発，平成 31 年度日本植物病理学会大会，つくば市 2019 年 3 月 18 - 20 日

井上博・久野裕・松島良・小林括平・山岡直人・西内巧・中神弘史・八丈野孝，オオムギうどんこ病菌による宿主細胞内デンブ分解機構の解析，平成 31 年度日本植物病理学会大会，つくば市，2019 年 3 月 18 - 20 日

井上智絵・香口智宏・西口正道・小林括平・山岡直人・西内巧・中神弘史・八丈野孝，宿主ペルオキシソームを標的とするオオムギうどんこ病菌エフェクターAPEC1の解析，平成31年度日本植物病理学会大会，つくば市，2019年3月18-20日

三野航司朗・久保稔・八丈野孝・宅見薫雄・吉田健太郎，ムギ類うどんこ病菌感染細胞におけるsingle-cell RNA-seqの開発，平成31年度日本植物病理学会大会，つくば市，2019年3月18-20日

三好沙季・賀屋秀隆・八丈野孝・小林括平，CRISPR/Cas9を用いた*N*'トバモウイルス抵抗性遺伝子感受性アレルの修復，平成31年度日本植物病理学会大会，つくば市，2019年3月18-20日

井上博・久野裕・松島良・小林括平・山岡直人・中神弘史・八丈野孝，オオムギうどんこ病菌による宿主細胞内デンプン分解メカニズムの解析，第13回ムギ類研究会，横浜市，2018年11月26、27日

長野眞依・和原未季・井上智絵・久野裕・小林括平・山岡直人・中神弘史・八丈野孝，オオムギうどんこ病菌による*mlo*侵入抵抗性打破メカニズムの解析．日本植物学会(2018年9月14~16日)

岩井さくら，上原由紀子，小林括平，山岡直人，持田恵一，八丈野孝．パターン認識シグナルはオオムギうどんこ病菌に対する宿主特異的抵抗性に寄与する．日本植物学会(2018年9月14~16日)

井上博，小林括平，山岡直人，中神弘史，八丈野孝．宿主表皮細胞に感染する絶対寄生菌の栄養吸収メカニズムの解析．日本植物学会(2018年9月14~16日)

井上智絵・武井博・香口智宏・小林括平・山岡直人・中神弘史・八丈野孝．宿主ペルオキシソームを標的とするオオムギうどんこ病菌エフェクタータンパク質の機能解析．日本植物学会(2018年9月14~16日)

戸田寛隆，小林括平，八丈野孝．オオムギの改良へ向けたTILLINGシステムの確立．生物系三学会中国四国支部大会(2018年5月12、13日)

清水茜，大熊祐之介，片岡創，小林括平，山岡直人，八丈野孝．ROSを指標としたオオムギうどんこ病菌の分子パターン物質の同定．生物系三学会中国四国支部大会(2018年5月12、13日)

長野眞依・和原未季・井上智絵・久野裕・小林括平・山岡直人・中神弘史・八丈野孝．オオムギ*mlo*変異による侵入抵抗性打破メカニズムの解析．生物系三学会中国四国支部大会(2018年5月12、13日)

八丈野孝，武井博，井上智絵，和原未季，中村篤史，岩井さくら，清水茜，長野眞依，戸田寛隆，小林括平，中神弘史，山岡直人．オオムギうどんこ病菌エフェクターの病原性機能および細胞内局在解析．日本植物病理学会(2018年3月25~27日)

長野眞依，和原未季，井上智絵，久野裕，小林括平，山岡直人，中神弘史，八丈野孝．*mlo*変異によるオオムギうどんこ病菌抵抗性の解析．日本植物病理学会関西西部会(2017年9月19、20日)

井上智絵，武井博，香口智宏，小林括平，山岡直人，中神弘史，八丈野孝．オオムギうどんこ病菌エフェクターAPEC1の機能解析．日本植物病理学会関西西部会(2017年9月19、20日)

和原未季，長野眞依，井上智絵，久野裕，小林括平，山岡直人，中神弘史，八丈野孝．*mlo*変異による侵入抵抗性を打破するオオムギうどんこ病菌の解析．日本植物病理学会平成29年度植物感染生理談話会(2017年7月27日~29日)

中村篤史，小林括平，山岡直人，中神弘史，八丈野孝．オオムギうどんこ病菌の付着器分泌型エフェクター候補APEC5の解析．日本植物病理学会平成29年度植物感染生理談話会(2017年7月27日~29日)

井上智絵，武井博，香口智宏，小林括平，山岡直人，中神弘史，八丈野孝．オオムギうどん

こ病菌エフェクターAPEC1 の病原性機能・日本植物病理学会平成 29 年度植物感染生理談話会  
(2017 年 7 月 27 日 ~ 29 日)

⑳中村篤史, 小林括平, 山岡直人, 八丈野孝・植物細胞壁を分解する病原系状菌の新規酵素の  
同定・生物系三学会中国四国支部大会(2017 年 5 月 13、14 日)

㉑岩井さくら, 上原由紀子, 小林括平, 山岡直人, 持田恵一, 八丈野孝・宿主特異性決定機構  
を解明するための植物免疫抑制プラキポディウムの作出・生物系三学会中国四国支部大会(2017  
年 5 月 13、14 日)

㉒井上智絵, 小林括平, 山岡直人, 八丈野孝・小胞体レトロトランスロコンは植物病原系状菌  
エフェクターの宿主細胞侵入に関与するのか?・生物系三学会中国四国支部大会(2017 年 5 月  
13、14 日)

㉓武井博・井上智絵・香口智宏・野村有子・和原未季・小林括平・西口正通・山岡直人・中神  
弘史・八丈野孝・オオムギうどんこ病菌の付着器分泌型エフェクター候補 APEC1 の機能解析・  
日本植物病理学会関西支部会・静岡・2016 年 9 月・

㉔和原未季・中村篤史・香口智宏・久野裕・小林括平・西口正通・山岡直人・八丈野孝・*mlo*  
変異による侵入抵抗性の打破メカニズムの解析 .日本植物学会平成 28 年度植物感染生理談話会 .  
神戸 . 2016 年 8 月 .

㉕武井博・香口智宏・和原未季・菅井維之・野村有子・小林括平・西口正通・山岡直人・中神  
弘史・八丈野孝・オオムギうどんこ病菌の付着器分泌型エフェクター候補 APEC1 の病原性機能  
と宿主細胞内局在 . 日本植物学会平成 28 年度植物感染生理談話会 . 神戸 . 2016 年 8 月 .

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~seisan/shokubyo/index.html>

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。