

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0031

研究課題名(和文)植物トリプトファン代謝系を利用した炭疽病菌と共棲菌の同時制御技術の開発

研究課題名(英文) Sustainable control of pathogens and beneficial endophytes with tryptophan-derived metabolism in plants

研究代表者

西條 雄介 (Saijo, Yusuke)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：50587764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：食料生産に甚大な被害を及ぼす植物病原菌の防除と植物の成長や生体防御に寄与する共棲菌の活用を同時に推進する技術の開発に向けて、病原糸状菌と共棲糸状菌が共存して病気の発現を抑えている仕組みの解明を進めた。ダイコン・小松菜などのアブラナ科植物から単離した共棲菌の中に、同時接種した病原菌の感染を抑制する植物保護菌(Colletotrichum属の一種、CgE)が含まれていた。CgEの植物保護機能には植物のエチレンを介した免疫系やトリプトファン由来の抗菌物質の産生経路が必要であることを示し、菌制御に有効な複数の代謝物質も同定した。また、CgEゲノムを解読し、近縁な病原菌株との比較ゲノム解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続的な食料生産技術の開発は世界的に喫緊の課題である。中でも、植物生産に甚大な被害を与える病原糸状菌(カビ)に対する作物保護技術を確立すること、並びに環境に低負荷で植物生産の増加を図ることは極めて重要な位置付けにある。植物が体表や組織内に病気を起こさずに宿している多様な共棲菌には植物の成長補助や生体防御に貢献するものが知られ、低肥料・持続型農業のシーズとして高い期待を集めている。したがって、上記の成果をベースに、一見相反する「病原糸状菌の防除」と「有用共棲菌の活用」を両立する技術の開発を推進することの意義は大きい。また、有効性が示された研究手法も他の系に活用が可能で、波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：To exploit beneficial plant-inhabiting microbes and repel plant pathogens, we investigate into the mechanisms by which plants accommodate pathogens without discernible disease symptoms. We reveal the endophytic fungus *Colletotrichum* spp (CgE) from radish roots, which colonize and protects the host from pathogens' infection and diseases. Co-inoculation of CgE restricts the growth of different root-infecting pathogenic fungi in Brassicaceae plants. Genetic studies in *Arabidopsis thaliana* indicate a critical role for ethylene-mediated defenses and tryptophan-derived antimicrobial metabolites of the host in CgE-mediated plant protection. We also reveal several host metabolites, of which exogenous application is effective in the proper control of CgE and host protection. Moreover, comparative genomics studies between CgE and its pathogenic relatives and transcriptome profiling of CgE-colonized plants gain important insight into the basis for endophyte-mediated plant protection.

研究分野：植物微生物相互作用、植物生理学

キーワード：共生 植物 微生物 二次代謝 病害抵抗性

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

## 1. 研究開始当初の背景

安全で高品質の食料を安定的・持続的に生産・供給することは世界的に喫緊の課題である。植物生産の20-30%が毎年病虫害によって失われており、その80%前後を占める病原糸状菌(カビ)に対して高持続性の作物保護技術を確立することは極めて重要である。同時に、環境に低負荷で植物生産(収量)の増加を図ることも重要である。共棲微生物は植物の体表や組織内に病気を起こさずに感染する微生物の総称で、植物の成長補助や生体防御に貢献するものが知られ、低肥料・持続型農業のシーズとして高い期待を集めている。したがって、一見相反する「病原糸状菌の防除」と「有用共棲菌の活用」を両立できれば画期的な作物保護戦略となる。しかしながら、共棲菌の大部分について未同定ないしは生理的役割が不明であり、病原菌と共棲菌とが共存する環境で互いに及ぼす影響についてはほとんど解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

ハクサイ・ダイコン・コマツナなどの重要野菜を含むアブラナ科植物は、根粒共生や菌根共生を行わない。研究代表者らは、野外で育てたアブラナ科植物から植物成長促進機能を有する複数の共棲糸状菌を単離した。興味深いことに、トリプトファン代謝の律速酵素を欠損した *cyp79b2 cyp79b3* 二重変異体植物では共棲菌の接種がむしろ成長抑制(病兆)を引き起こした。すなわち、共生(植物成長促進)機能の発現には、宿主植物によるトリプトファン代謝系(病原菌抵抗性にも寄与する抗菌性物質の生成経路を含む)を介した共棲菌の制御が重要であることが示唆された。よって、本代謝系の制御機構を解明して活用すれば共棲菌と病原菌の同時制御が可能になると考えた。そこで、新規の有用共棲菌の単離・同定を進めるとともに、すでに単離した菌株(*Colletotrichum* 属菌、病原型・共棲型の諸系統を代表者が所有)をモデルに用いてトリプトファン代謝系による共棲菌・病原菌の制御機構を明らかにする。さらに、本代謝系の活用・強化に適合する化合物と有用共棲菌(の組合せ)及びそれらの活用技術を創出することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 共棲糸状菌資源の単離・培養・機能解析

圃場栽培のコマツナ・ダイコンから共棲糸状菌を単離・培養し、ライブラリを得た。単離菌をシロイヌナズナに接種して機能(植物成長促進機能や植物保護機能)を評価し、有用菌株の探索・同定を進めた。

### (2) モデル共棲菌及び炭疽病菌との相互作用におけるトリプトファン代謝系の役割の解明

シロイヌナズナの *cyp79B2 cyp79B3* 変異体を始め、様々なトリプトファン代謝経路の律速・分岐ステップやその制御因子の欠損変異体について、共棲菌による成長促進効果や病原菌抵抗性への影響を調査した。

### (3) 糸状菌制御に有効なトリプトファン代謝産物・派生物の有機合成と同定

有機合成したトリプトファン代謝産物をシロイヌナズナの野生型や上記の代謝経路の欠損変異体に投与して、共棲菌の共生機能や病原菌抵抗性に与える影響を調べた。

### (4) 共棲菌がアブラナ科植物の生育にもたらす影響の解析

シロイヌナズナに加えてコマツナ等に共棲菌を接種して植物の生育や炭疽病抵抗性への影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 共棲糸状菌資源の単離・培養・機能解析

単離菌株をリン栄養欠乏または十分条件においてシロイヌナズナやコマツナにおいて植物成長促進機能を示す複数菌株を得た。しかしながら、モデル共棲菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) ほど安定して同効果を示す菌株は得られなかった。一方、Ctには見られない、植物保護(共接種すると病原菌の感染を抑制する)機能を有する *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) の内生株 CgE とともに近縁な病原株 CgP が得られたため、特に CgE と CgP に着目して比較ゲノム解析や比較トランスクリプトーム解析を行った。CgE と CgP の間で完全同一の遺伝子は全遺伝子中の 0.06% であり、当初の予想ほど近縁ではなかったため、両菌の共接種(CgE による CgP の病原性抑制)時の菌遺伝子の発現解析が可能になった。両者の差解析データをもとに共生型(植物保護機能)と病原

型の遺伝子基盤を推定するベースが得られた。さらに、トリプトファン代謝経路以外にもエチレン応答制御因子の欠損変異体植物においてもCgEが病原性を発現することを突き止め、CgEの潜在的病原性を抑制し、植物保護機能を発現させるにはエチレンが重要であることを示した。現在、論文の投稿準備を進めている。

(2) モデル共棲菌及び炭疽病菌との相互作用におけるトリプトファン代謝系の役割の解明  
シロイヌナズナの70アクセッションにおいて、Ct接種の成長促進効果(相互作用様式)に関する種内多型を記述した。地上部と地下部の間で高い相関が認められた。標準アクセッションであるCol-0と比較して顕著に異なるアクセッションに着目して、リン枯渇応答の調査やトリプトファン二次代謝物質の定量を行い、Ct共生との相関性を解析した。Ct共生と相関して蓄積量が増す代謝物質をいくつか同定し、現在その生合成や代謝に関わる(と予想される)酵素遺伝子の欠損体植物を用いて同代謝系の機能解析を進めている。

(3) 糸状菌制御に有効なトリプトファン代謝産物・派生物の有機合成と同定  
宿主シロイヌナズナのトリプトファン代謝経路の欠損植物にCgEや他のPGP真菌を接種すると病原性を発現する。ここに同代謝系の関連化合物の合成物を投与することにより病原性の発現を抑制する代謝物質を複数種、同定した。さらに、*cyp79B2 cyp79B3*変異体植物においては、糸状菌の病原性発現に伴い、分泌性感染促進因子(エフェクター)の候補遺伝子の発現が抑制されずに誘導されてしまうこと、並びに上記の代謝物質の投与によりその抑制を回復させられることも示し、共生の化学基盤を明らかにした。

(4) 共棲菌がアブラナ科植物の生育にもたらす影響の解析  
Ctに関してはコマツナ等アブラナ科野菜においても成長促進効果を示すことを確認し、現在、野外圃場においても共生効果の検証を進めている。CgEや他の植物成長促進機能を有する単離糸状菌についても同様の解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)(\* corresponding author)

Saijo Y.\* and Loo P.E. (2019) Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist* in press. 査読有

Ogita N., Okushima Y., Tokizawa M., Yamamoto Y.Y., Tanaka M., Seki M., Makita Y., Matsui M., Yoshiyama Okamoto, K., Sakamoto T., Kurata T., Hiruma K., Saijo Y., Takahashi N. and Umeda M. (2018) Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis. *Plant J* 94, 439-453. DOI: 10.1111/tpj.13866 査読有

Saijo Y.\*, Loo P.E., and Yasuda S. (2018) Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J.* 93, 592-613. Special Issue Plant Biotic Interactions 2018. DOI:10.1111/tpj.13808 査読有

藤雅子、清水幸子、西條雄介 (2018) 植物による DAMP の認識と免疫制御、*アグリバイオ、北隆館*, 2 (9) :73-75 査読無

藤雅子、西條雄介 (2018) パターン認識受容体を活用した高持続性の植物防御技術の開発に向けて、*植物の生長調節、植物化学調節学会 会誌*, 53 (1), p43-52 DOI:10.18978/jscrp.53.1\_43 査読無

Yasuda, S., Okada, K. and Saijo Y.\* (2017) A look at plant immunity through the window of the multitasking coreceptor BAK1. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 10-18. DOI: 10.1016/j.pbi.2017.04.007 査読有

Lee, T., H., Kitagawa, N., Hiruma, K. and Saijo Y.\* (2017) Host immunity-mediated control of endophytic/symbiotic microbes in plants. *J. Environ. Biotech.* 17. (植

物免疫システムによる内生・共生微生物の制御 2017, 環境バイオテクノロジー学会誌) 査読有

[学会発表](計 9 件)

Kuldanai Pathompitaknukul, Kei Hiruma, Yusuke Saijo, “ Endophyte-mediated control of fungal pathogenesis in Arabidopsis thaliana, ” 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019.3.19

山口紫苑, 安田盛貴, 葉紅, 田中碧, 渡邊むつみ, 峠隆之, 晝間敬, 西條雄介, “ シロイヌナズナにおけるリン欠乏及び内生糸状菌との相互作用に関する自然変異の解析, ” 第 60 回日本植物生理学会年会, 2019.3.15

安田盛貴, 晝間敬, 鶴川和希, 仙波一彦, 渡邊むつみ, 田中啓介, 太治輝昭, 峠隆之, 中尾佳亮, 西條雄介, “ シロイヌナズナにおける植物成長促進真菌の感染促進エフェクター候補遺伝子の機能解析と宿主代謝物質を介した発現抑制, ” 第 60 回日本植物生理学会年会, 2019.3.15

晝間敬, 西條雄介, “ 内生糸状菌との相互作用を介したアブラナ科植物のリン栄養獲得戦略, ” 日本植物学会第 82 大会, 2018.9.16

安田盛貴, 西條雄介 “ シロイヌナズナのトリプトファン代謝物による内生糸状菌の病原性制御機構の解析, ” 植物の栄養研究会第 4 回研究交流会, 2018.9.7

Shigetaka Yasuda, Kei Hiruma, Shion Yamaguchi, Lee Tae Hong, Semba Kazuhiko, Mutsumi Watanabe, Takayuki Tohge, Yoshiaki Nakao and Yusuke Saijo, “ Tryptophan metabolite-based control of endophytic fungi in beneficial association with Arabidopsis thaliana, ” 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018.3.28

Shion Yamaguchi, Shigetaka Yasuda, Nozomi Kitagawa, Mutsumi Watanabe, Takayuki Tohge, Kei Hiruma and Yusuke Saijo, “ Natural variations of nutrition-dependent interactions with a root-colonizing endophytic fungus in Arabidopsis thaliana, ” 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018.3.28

Kuldanai Pathompitaknukul, Kei Hiruma and Yusuke Saijo, “ Endophyte-mediated control of fungal pathogenesis in Arabidopsis thaliana , ” 5th plant genomics & gene editing congress asia, Bangkok Thailand, 2018.3.27

Kuldanai Pathompitaknukul, 晝間 敬、西條雄介, “ Colletotrichum endophyte-mediated control of fungal pathogenesis in Arabidopsis thaliana, ” 平成 30 年度日本植物病理学会大会, 2018.3.26

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：中尾 佳亮

ローマ字氏名：(NAKAO, yoshiaki)

所属研究機関名：京都大学

部局名：工学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：60346088

研究分担者氏名：藤田 美紀

ローマ字氏名：(FUJITA, miki)

所属研究機関名：国立研究法人理化学研究所

部局名：環境資源科学研究センター

職名：研究員

研究者番号(8桁)：70332294

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：晝間 敬

ローマ字氏名：(HIRUMA, kei)

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。