

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

植物と病原体の攻防における分子機構

Molecular elucidation of plant-pathogen interactions

課題番号：17H06172

白須 賢 (SHIRSU, KEN)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター



研究の概要（4行以内）

植物や動物は“自然免疫系”と総称される高度に発達した細胞ベースの防御システムを進化させ、非自己であるウイルス、細菌、カビ、線虫など多種多様な病原体由来の物質を感知し、身を守っている。植物免疫機構を司る重要タンパク質およびその複合体の同定と、それを破る病原体の因子を、ゲノム解析等最先端技術を用いて同定し、その機能を明らかにする。

研究分野：農学・境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分子間相互作用、生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

植物や動物は“自然免疫系”と総称される高度に発達した細胞ベースの防御システムを進化させ、非自己であるウイルス、細菌、カビ、線虫など多種多様な病原体由来の物質を感知し、身を守っている。これに対し病原体は、様々な低分子化合物やタンパク質を宿主細胞内に多数注入することにより、この自然免疫系を抑制し感染の確立を狙う。これらの複雑な免疫機能に関与する多くの因子が明らかになってきているものの、それぞれの因子が必ずしも生化学的な機能として繋がってはならず、植物免疫システムは依然として不明な部分が多い。また、この植物免疫システムを凌駕するために多種多様に進化した病原体は、ユニークな攻撃戦略を確立しているはずだが、その理解はごく一部に限られている。

2. 研究の目的

植物免疫機構を司る重要タンパク質およびその複合体の構成因子を同定する。また、病原体の病原性因子を同定し、その植物ターゲットを同定することで、病原性獲得の本質を理解する。

3. 研究の方法

遺伝学や質量分析器を用いた生化学的方法を用いて、免疫受容体候補とその複合体、その下流因子の同定とその遺伝学的・生化学的機能解析をおこなう。また、病原体の多様性から病原体因子を同定するため、各種病原体のゲノム・トランスクリプトームをおこない、

病原体解析の分子解析基盤確立を推進する。

4. これまでの成果

主要目的の一つであった植物免疫に重要な新規レセプターを同定し、その機能を明らかにした。具体的には、過酸化水素およびキノン化合物の認識ができなくなるシロイヌナズナ変異体を11同定し、全ゲノムシークエンス解析により原因遺伝子「CARD1」を同定した。CARD1は受容体様キナーゼ（RLK）をコードしており、過酸化水素およびキノン化合物の認識に重要な役割を果たすと考えられた。CARD1は陸上植物系統全体にわたって高度に保存されていた。CARD1遺伝子はシロイヌナズナのほとんどの組織で発現しており、CARD1タンパク質は細胞膜に局在していることが明らかになった。タンパク質のアミノ酸配列の分析により、CARD1には細胞外ドメインのC末端に特異的な6個のシステイン（C）残基（C395、C405、C421、C424、C434、C436）が含まれていた。これは、CARD1を含むLRR-RLKサブグループVIII-1でのみ見られた。これらのシステイン残基の重要性を評価するために、各システインを個別にセリン（S）に変異させたところ、CARD1C395SとCARD1C405Sのみが機能できなかった。したがってC395とC405は、CARD1による過酸化水素とキノン化合物の認識に重要な役割を果たすと考えられた。CARD1依存性シグナル伝達の下流のイベントを解明するために、最初にcard1変異体では、キノン化合物によるMAPKの活性化が起こらないことを確認し、次に、過酸化水素および

キノン化合物処理後の遺伝子発現を解析した結果、CARD1 依存性の発現遺伝子が傷、免疫、ストレスへの応答に関与していることが示された。これにより、CARD1 が植物の免疫にとっても重要である可能性が示され、実際に、card1 変異体ではトマト斑葉細菌による感染の度合いが高くなっていることを確認した。また、トマト斑葉細菌は気孔を通過して葉に侵入するため、葉の気孔の様子を観察し、野生型にキノン化合物を投与すると気孔が閉じるのに対し、card1 変異体では気孔は閉じないことが分かった。これらの結果から、CARD1 は、細菌感染時に自己が発生する過酸化水素そしてキノン関連化合物に応答して、防御・ストレス関連の遺伝子発現を誘導し、さらに気孔を閉じることで、耐病性に貢献していると考えられる。

また、寄生植物でのキノン化合物応答による吸器誘導を阻害するテトラフルオロ-1, 4-ベンゾキノン (TFBQ) をシロイヌナズナに処理したところ、細胞内カルシウム濃度の上昇が阻害されました。このことから、CARD1 において、TFBQ は同じ結合部位を競争阻害している可能性が示された。さらに、寄生植物ストライガとコシオガマのCARD1 相同遺伝子が変異体のキノン化合物認識機能を相補できることから、寄生植物もこのタンパク質を用いてキノン化合物を認識することが明らかになった。

さらに、リン酸化定量的プロテオーム解析や、ケミカルバイオロジー等のツールを用いて植物免疫に重要な遺伝子を複数単離でき、詳細解析をおこなっている。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析も安価で解析系を開発して、病原体応答等の発現解析をおこなった。

病原体側に研究においては、次世代シーケンサーPacBio Sequel および Sequel2 を用いて、多くの病原体のゲノム配列を決定した。炭疽病菌とフザリウム菌を中心として、病原体糸状菌の染色体レベルでの比較ゲノム解析をおこない、病原性に関与するミニ染色体の同定および病原性エフェクターの同定をおこなった。この他にも卵菌、線虫、寄生植物と多様な病原体のゲノムについても、高精度のゲノムアセンブリをすでに公開している。

5. 今後の計画

植物免疫に重要な遺伝子の詳細機能解析をさらに推し進める。具体的には、変異体の作成およびそれらの交配による多重変異体の作成をおこない、植物免疫に関する表現型を解析する。この分子レベルでの解析には開発した安価なトランスクリプトーム解析をおこなうほか、この遺伝子がコードするタンパク質に対する抗体を作成し、その細胞間局在および翻訳後修飾等の挙動を詳細に解析す

る。病原体に関しては、病原体のゲノムシーケンスをさらに推進し、比較ゲノム解析から予想される病原性因子を中心に本研究室で開発した技術を用いて多重変異体を作成し、病原性の詳細解析を進める他、特異的抗体を作成するなどして、その生化学的機能を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1.Goto, Y., Maki, N., Ichihashi, Y., Kitazawa, D., Igarashi, D., Kadota, Y., Shirasu, K. Exogenous treatment with glutamate induces immune responses in Arabidopsis. (2020) MPMI. 33: 474-487.

2.Yoshida, S., et al. Genome sequence of *Striga asiatica* provides insight into the evolution of plant parasitism. (2019) Curr. Biol. 29: 3041-3052.E4.

3.Kadota, Y., Liebrand, T. W., Goto, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Menke, F. L., Torres, M., Molina, A., Zipfel, C., Coaker, G. and Shirasu, K. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector - and PAMP - triggered immunity in plants. (2019) New Phytol. 221:2160-2175.

4.Tsushima, A., Gan, P., Kumakura, N., Narusaka, M., Takano, Y., Narusaka, Y., Shirasu, K. Genomic plasticity mediated by transposable elements in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum* (2019) Genome Biol and Evol. evz087

5.Mutuku, J. M., Cui, S., Hori, C., Takeda, Y., Tobimatsu, Y., Nakabayashi, R., Mori, T., Saito, K., Demura, T., Umezawa, T., Yoshida, Y., Shirasu, K. The structural integrity of lignin is crucial for resistance against *Striga hermonthica* parasitism in rice. (2019) Plant Physiol. 179: 1796-1809.

6.Kumakura, N., Ueno, A., Shirasu, K. (2018) Establishment of a selection marker recycling system for sequential transformation of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. Mol. Plant Path. 20:447-459.

賞 Thomson Reuters Highly Cited Researcher (2017, 2018, 2019)

7. ホームページ等

http://plantimmunity.riken.jp/index_ja.html