

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02204

研究課題名(和文) 宿主侵入ステージにおいて高発現する炭疽病菌エフェクター群の研究

研究課題名(英文) Studies on Colletotrichum effectors highly expressed at host invasion stage

研究代表者

高野 義孝 (Takano, Yoshitaka)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：80293918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウリ類炭疽病菌は宿主植物に侵入するためにはメラニンによって着色した付着器の形成を必要とする。しかし非宿主植物上では強力な抵抗反応により、付着器からの侵入菌糸形成がブロックされることから、エフェクターによるこのステージにおける抵抗性抑制の重要性が推察されている。今回、第一に、この侵入ステージにおいて高発現し、ウリ類炭疽病菌の病原性に関与するエフェクター分子について、その植物免疫抑制能、植物細胞内における局在性などを明らかにした。さらにウリ類炭疽病菌の複数系統のRNAシーケンスによる病原性エフェクター候補の選抜、続く標的遺伝子破壊解析により、本菌の3種の新規病原性エフェクター遺伝子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原糸状菌は宿主植物に感染するために、エフェクターと総称される病原性関連分泌タンパク質を用いて宿主の免疫反応を抑制すると考えられている。しかし、どのようなエフェクターが重要なのかについては不明な点が多い。本研究では、ウリ科作物に病害を引き起こすウリ類炭疽病菌を対象として、すでに同定に成功している病原性エフェクターの植物免疫抑制能などを明らかにしたとともに、本菌の3種の新規病原性エフェクターの発見に成功している。この成果は、エフェクター研究において大きな学術的意義があるとともに、本研究を起点としてエフェクターによる宿主感染戦略を解明できれば、新たな作物保護技術の開発への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：To invade host plants, *Colletotrichum orbiculare* needs to develop appressoria pigmented with melanin. However, on nonhost plants, the pathogen's appressoria fail to develop invasive hyphae because of strong defense responses of the nonhost plants, implying the importance of plant immunity suppression by effectors at this infection stage. In this study, we first focused on one effector that is highly expressed at this invasion stage and is involved in the virulence of *C. orbiculare*. We revealed the ability of this virulence effector for plant immunity suppression and localization of the effector inside plant cells. Also, based on RNA sequencing of multiple *C. orbiculare* isolates for selection of virulence effector candidates and subsequent targeted gene disruption of the candidates, three novel virulence effector genes of *C. orbiculare* have been discovered.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原糸状菌 非宿主抵抗性 エフェクター 宿主特異性 ウリ類炭疽病菌 ウリ科作物 付着器
ペンサミアナタバコ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物病原糸状菌が植物に感染できるか否かは、その植物の抵抗反応を回避・抑制できるかどうかにかかっている。植物抵抗性の抑制において重要な役割を担っているのが「エフェクター」である。エフェクターは病原菌が自身の病原性を発揮するために分泌するタンパク質として定義できる（広義には低分子化合物も含まれる）。しかし、植物病原菌がどのようなエフェクターを駆使して、植物への感染を成立させているのか、不明な点が多い。筆者のグループは、植物病原糸状菌の一群である炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) と植物の相互作用について研究しており、特にキュウリ、メロン、スイカなどのウリ科作物に病害を引き起こすウリ類炭疽病菌 (*C. orbiculare*) に焦点を当てている。

(2) 炭疽病菌はメラニンにより着色した付着器を形成し、本細胞より植物内へ侵入菌糸を形成する。これまでのウリ類炭疽病菌の研究により、(i) 本菌は非宿主植物上でもメラニン化した付着器を形成できること、(ii) しかし、非宿主植物上ではその強力な抵抗反応により、付着器からの侵入菌糸形成はことごとくブロックされること、を明らかにしていた。このことは、「メラニン化付着器からの侵入ステージにおける植物抵抗性の抑制が、感染の成否において非常に重要である」ことを物語っており、エフェクターの働きがこの局面の鍵を握っていると推定される。しかし、上述のとおり、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

(1) ウリ類炭疽病菌は宿主侵入のためにメラニン化した付着器を形成する。これまでの研究により、付着器からの侵入ステージにおける植物抵抗性抑制の成否が、感染成立のために非常に重要であることが示されていた。本研究では、付着器による宿主キュウリへの侵入ステージにおいて高発現するエフェクター群に焦点をあてる。まず、第一にウリ類炭疽病菌のウリ科作物への病原性に必要なエフェクター ECAP12 について、標的とする植物因子への作用をはじめとする抵抗性抑制のための分子機能を解明する。

(2) 第二に本菌の病原性に必要な新規の病原性エフェクターを発見するために、複数のウリ類炭疽病菌の菌株で共通して「キュウリ上で形成された付着器で高発現する」エフェクター様遺伝子群を網羅化し、続いて包括的な機能解析をおこなう。これらの研究により、「付着器からの物理的侵入と連動し、宿主免疫を抑制するエフェクター群」のアウトラインを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ECAP12 の機能解析： ECAP12 は BiP と呼ばれる小胞体に局在するタンパク質に結合することを明らかにしているが、植物細胞内における ECAP12 とベンサミアナタバコの NbBiP5 の共局在性について検討するために、それぞれのタンパク質に蛍光タンパク質を付加したものをアグロバクテリウム注入法によってベンサミアナタバコ細胞において一過的に発現させ、続いて共焦点レーザー顕微鏡での観察に供した。また、ECAP12 を一過的に発現させたベンサミアナタバコにおける植物免疫応答についても調査した。トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) のエフェクター SIX6 は、ECAP12 と一定の相同性を有する。そのため、SIX6 を対象に、NbBiP5 への結合性、植物細胞における活性酸素抑制能、さらに ECAP12 破壊破壊株への相補性について調査し、これらの解析に基づく ECAP12 と SIX6 の機能比較を実施した。また、ECAP12 を恒常的に発現する形質転換シロイヌナズナを作出し、この形質転換シロイヌナズナにおける植物免疫応答 (PAMP 誘導活性酸素生成など) について調査し、ECAP12 がシロイヌナズナの免疫応答を抑制できるかを調査した。

(2) ウリ類炭疽病菌の新規病原性エフェクターの探索： ウリ類炭疽病菌の複数系統について、キュウリ接種 1 日後の RNA シークエンスを実施した。得られた RNA シークエンスデータは、すでにデータを取得しているウリ類炭疽病菌 104-T 系統のデータと統合解析し、いずれのウリ類炭疽病菌系統においてもキュウリ侵入ステージにおいて高発現しているエフェクター様遺伝子群を網羅的に選抜した。続いて、これら選抜した候補遺伝子に対して、標的遺伝子破壊株を作出し、キュウリなどへの接種試験を実施した。接種試験の結果に基づき、同定に成功した病原性に必要なウリ類炭疽病菌エフェクター遺伝子については、続いて ECAP12 遺伝子破壊株背景で破壊し、さらに病原性が低下するかを調べた。複数の重要エフェクターが同定されると予想しており、それに合わせ、3 重、4 重変異体などの多重変異体を作出し、キュウリへの感染に必要とされるウリ類炭疽病菌のエフェクター群を掌握することとした。

4. 研究成果

(1) ECAP12 の局在解析および SIX6 との機能比較解析： NbBiP5 と ECAP12 の植物細胞内における結合について、細胞生物学的側面からのデータを得るために、NbBiP5 に mCherry を融合したタンパク質と ECAP12 に GFP を融合したタンパク質をベンサミアナタバコに同時に発現させ、その共局在の有無を調査した結果、mCherry と GFP の蛍光シグナルは、高い共局在性を示した(図1)。さらに mCherry に小胞体残留シグナルである HDEL を付加したタンパク質の共発現解析より、NbBiP5 と ECAP12 がともに小胞体に局在することを明らかにした。トマト萎凋病菌の SIX6 の ECAP12 との機能比較解析については、まず、NbBiP5 への結合性を共免疫沈降解析により調査した結果、SIX6 は NbBiP5 と相互作用することが示唆された。さらに、SIX6 をベンサミアナタバコにおいて一過的に発現させた結果、f1g22 が誘導する活性酸素の生成が抑制された。また、SIX6 遺伝子を ECAP12 遺伝子破壊株に導入することにより、破壊株の病原性は野生株と同等レベルにまで回復した(図2)。これらの結果は、ウリ類炭疽病菌のエフェクター ECAP12 とトマト萎凋病菌のエフェクター SIX6 が類似した分子機能を有することを強く示唆した。

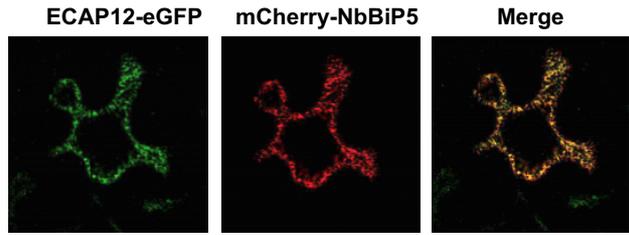


図1. ECAP12とNbBiP5はベンサミアナタバコ細胞において一過的に発現させた場合、共局在性を示す。

(2) ECAP12 の植物免疫抑制能： また、ECAP12 を一過的に発現させたベンサミアナタバコについて、PAMP 誘導免疫の状態を調べた結果、細菌 PAMP (f1g22) によって引き起こされる活性酸素生成を ECAP12 は顕著に抑制することを明らかにした。さらに、ECAP12 を発現させたベンサミアナタバコに対して、ウリ類炭疽病菌 104-T 系統を接種したところ、ECAP12 の発現は同病原菌への罹病性を高めることが明らかになった。並行して、ECAP12 を恒常的に発現させる形質転換シロイヌナズナを作成し、PAMP 誘導免疫への影響を調査した結果、ECAP12 の発現はシロイヌナズナにおいても、f1g22 誘導活性酸素生成を明確に抑制し、この結果より、ECAP12 がシロイヌナズナの免疫応答を抑制する機能を有することが明らかとなった。

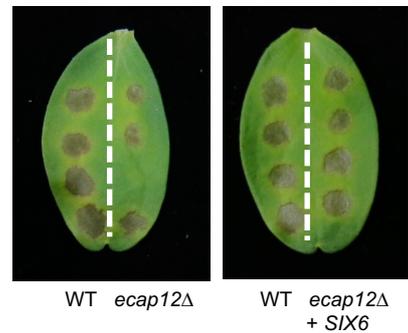


図2. ECAP12遺伝子破壊株が示すウリ科作物への病原性低下という欠損は、SIX6遺伝子の導入によって相補される。

(3) ウリ類炭疽病菌の新規病原性エフェクターの探索： ウリ類炭疽病菌の5系統について、キュウリ接種1日後のRNAシーケンスを新たに実施した。得られたRNAシーケンスデータと、すでにデータを得ているウリ類炭疽病菌 104-T 系統のデータと統合解析し、合計6系統のいずれにおいてもキュウリ侵入ステージにおいて高発現しているエフェクター様遺伝子を網羅的に選抜した。選抜した33遺伝子について、その標的破壊株を作成し、それらについてキュウリへの接種試験を実施した。その結果、4遺伝子の標的破壊株において、野生株と比較して、ウリ科作物への病原性の低下が見出された。そのうちの1遺伝子は、すでに同定に成功していた ECAP12 遺伝子であった。一方、残り3遺伝子は新規の遺伝子であり、新たに同定したこの3種のエフェクター遺伝子をそれぞれ EPC1 (effector proteins for cucurbit infection 1)、EPC2、EPC4 と命名した(図3)。なお、この段階において、ECAP12 を EPC3 と改名した。次に、EPC 遺伝子の発現パターンを明らかにした。その結果、いずれの EPC 遺伝子も接種前の孢子細胞内での発現は低く、キュウリに接種後にその明確な発現誘導が起きることを明らかにした。

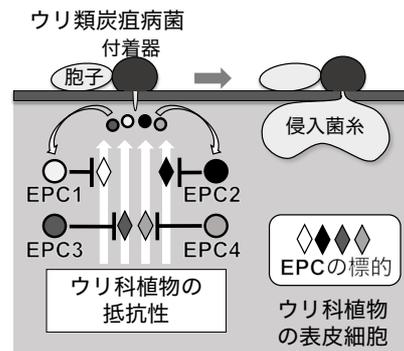


図3. 4つのエフェクター遺伝子(EPC1~EPC4)はウリ類炭疽病菌のウリ科作物への病原性に関与する。

(4) 同定した病原性エフェクター遺伝子の多重破壊株の作出と性状解析： 続いて、EPC1 遺伝子と EPC2 遺伝子の二重破壊株を作成して、キュウリおよびメロンへ接種した結果、単一遺伝子破壊株と比較して、二重破壊株では病原性の更なる低下が観察された。さらに、EPC1、EPC2、EPC3 (旧名 ECAP12)、EPC4 遺伝子に対する4重遺伝子破壊株を作成した。その結果、4重遺伝子破壊株はウリ科作物に対する病原性はほぼ失っていた。興味深いことに、ベンサミアナタバコに対する4重遺伝子破壊株の病原性は本菌野生株と同様であった。本結果より、発見に成功した4種のエフェクター EPC1、EPC2、EPC3 (ECAP12)、EPC4 は、ウリ類炭疽病菌のウリ科作物に対する宿主特異性成立において重要な役割を担っていることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zhang Ru, Isozumi Noriyoshi, Mori Masashi, Okuta Ryuta, Singkaravanit-Ogawa Suthitar, Imamura Tomohiro, Kurita Jun-Ichi, Gan Pamela, Shirasu Ken, Ohki Shinya, Takano Yoshitaka	4. 巻 297
2. 論文標題 Fungal effector SIB1 of <i>Colletotrichum orbiculare</i> has unique structural features and can suppress plant immunity in <i>Nicotiana benthamiana</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101370 ~ 101370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Singkaravanit Ogawa Suthitar, Kosaka Ayumi, Kitakura Saeko, Uchida Kotaro, Nishiuchi Takumi, Ono Erika, Fukunaga Satoshi, Takano Yoshitaka	4. 巻 108
2. 論文標題 Arabidopsis <i>CURLY LEAF</i> functions in leaf immunity against fungal pathogens by concomitantly repressing <i>SEPALLATA3</i> and activating <i>ORA59</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen Jinlian, Inoue Yoshihiro, Kumakura Naoyoshi, Mise Kazuyuki, Shirasu Ken, Takano Yoshitaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative transient expression analyses on two conserved effectors of <i>Colletotrichum orbiculare</i> reveal their distinct cell death inducing activities between <i>Nicotiana benthamiana</i> and melon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1006-1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Taiki, Chen Jinlian, Mise Kazuyuki, Takano Yoshitaka	4. 巻 16
2. 論文標題 Multiple <i>Colletotrichum</i> species commonly exhibit focal effector accumulation in a biotrophic interface at the primary invasion sites in their host plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1935604 ~ 1935604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2021.1935604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irieda Hiroki, Takano Yoshitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Epidermal chloroplasts are defense-related motile organelles equipped with plant immune components	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22977-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gan P., Tsushima A., Hiroshima R., Narusaka M., Takano Y., Narusaka Y., Kawaradani M., Damm U., Shirasu K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Colletotrichum shioi sp. nov., an anthracnose pathogen of Perilla frutescens in Japan: molecular phylogenetic, morphological and genomic evidence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50076-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Isozumi Noriyoshi, Inoue Yoshihiro, Imamura Tomohiro, Mori Masashi, Takano Yoshitaka, Ohki Shinya	4. 巻 514
2. 論文標題 Ca ²⁺ -dependent interaction between calmodulin and CoDN3, an effector of Colletotrichum orbiculare	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 803 ~ 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Irieda H, Inoue Y, Mori M, Yamada K, Oshikawa Y, Saitoh H, Uemura A, Terauchi R, Kitakura S, Kosaka K, Singkaravanit-Ogawa S, and Takano Y.	4. 巻 116
2. 論文標題 Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	6. 最初と最後の頁 496-505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1807297116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kosaka A, and Takano Y.	4. 巻 84
2. 論文標題 Nonhost resistance of Arabidopsis thaliana against Colletotrichum species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 305-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-018-0799-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大野恵梨佳・小内 清・加藤大明・海道真典・三瀬和之・寺内良平・高野義孝
2. 発表標題 シロイヌナズナのRLP23遺伝子は灰色かび病菌への抵抗性に関与している
3. 学会等名 令和2年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川泰生・井上喜博・Trinh Thi Phuong Vy・Pamela Gan・海道真典・三瀬和之・鳴坂 義弘・白須 賢・高野義孝
2. 発表標題 近縁炭疽病菌との比較解析によるウリ類炭疽病菌の宿主適応に関与する遺伝子の単離および解析
3. 学会等名 令和2年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosaka, A., Pastorczyk, M., Nishiuchi, T., Suemoto, H., Ishikawa, A., Kaido, M., Mise, K., Bednarek, P., and Takano, Y.
2. 発表標題 bak1-5 mutation uncouples tryptophan-dependent and independent postinvasive immune pathways triggered in Arabidopsis thaliana by multiple fungal pathogens
3. 学会等名 令和元年度 日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue, Y., Vy, T. T. P., Yamada, K., Ogawa, S. S., Gan, P., Shirasu, K. and Takano, Y.
2. 発表標題 In planta transcriptome analyses reveal three novel core effectors of the cucumber anthracnose fungus, <i>Colletotrichum orbiculare</i> , essential for full virulence on Cucurbitaceae host plants.
3. 学会等名 2019 IS-MPMI Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhang, R., Inoue, Y., Kaido, M., Mise, K. and Takano, Y.
2. 発表標題 TFV1 is preferentially expressed in plant infection phase and is required for full virulence of <i>Colletotrichum orbiculare</i> on cucurbit plants.
3. 学会等名 2019 IS-MPMI Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 喜博、Pamela Gan、白須 賢、鳴坂 義弘、高野 義孝
2. 発表標題 比較ゲノム・トランスクリプトーム解析によるウリ類炭疽病菌の強病原性関連因子の探索
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川泰生、井上喜博、Pamela Gan、海道真典、三瀬和之、鳴坂 義弘、白須 賢、高野義孝
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌の宿主特異性に関する研究：アルファルファ炭疽病菌との比較解析
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ru Zhang, Yoshihiro Inoue, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Yoshitaka Takano
2. 発表標題 TFV1 is preferentially expressed in plant infection phase and is required for full virulence of Colletotrichum orbiculare on cucurbit plants
3. 学会等名 第18回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jinlian Chen, Yoshihiro Inoue, Saeko Tanaka, Suthiar Singkaravanit-Ogawa, Shinya Ohki, S, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Yoshitaka Takano
2. 発表標題 Studies on the plant recognition of the C-terminal region of the Colletotrichum orbiculare effector NLP1
3. 学会等名 平成31年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳野直人、井上喜博、田中冬樹、海道真典、三瀬和之、高野義孝
2. 発表標題 根部接種におけるウリ類炭疽病菌とメロン実生の相互作用に関する研究
3. 学会等名 平成31年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ポーランド	Polish Academy of Science			