

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06121

研究課題名(和文)植物アポプラストにおける病原菌に対する防御メカニズム

研究課題名(英文)Defense mechanism in plant apoplastic space against plant pathogens

研究代表者

竹田 匠 (Takeda, Takumi)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・主任研究員

研究者番号：80423036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イネのアポプラストにおけるいもち病菌に対する耐病性機構に関する研究を遂行した。イネ由来のOsCBMIPは病原菌由来のCBM1と結合し、その機能を阻害することが明らかとなった。また、遺伝子組換えイネを用いた実験結果より、OsCBMIPはいもち病菌の感染抑制に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、イネ由来のソーマチンはいもち病菌由来の1,3-GBPと結合し、その機能を阻害するが、いもち病菌はThBP15kとThBP24kによりソーマチンの機能を阻害していることが明らかとなった。これらの様に、植物はアポプラストに多様なタンパク質を分泌し、植物病原菌の感染を抑制していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いもち病菌はイネの生育や米の収穫量に甚大な被害を及ぼす病原菌である。いもち病菌に対する防除法を確立するためには、イネの耐病性を解明することが重要である。いもち病菌がイネに感染する際、多種の多糖分解酵素をイネのアポプラストに分泌し、イネの細胞壁多糖を分解している。これに対して、イネは新規なOsCBMIPを用いて、多糖分解酵素の作用を阻害していることが明らかとなった。また、イネのソーマチンはいもち病菌の細胞壁に局在する1,3-GBPの機能を阻害していることが明らかとなった。この様に、イネのアポプラストにおけるタンパク質の分子機構を利用し、新たないもち病菌の防除法を確立することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：A rice protein (OsCBMIP) that bound to CBM1 of fungal enzymes was identified. Binding of OsCBMIP to CBM1 caused to inhibit the activity of fungal enzymes. OsCBMIP-knockdown transgenic rice plants showed the reduced defense against *Magnaporthe oryzae*, indicating the involvement of OsCBMIP in rice defense. In addition, binding of rice thaumatins to 1,3-glucan binding protein (1,3-GBP) of *M. oryzae* was demonstrated. 1,3-GBP is binding to 1,3-glucan of *M. oryzae* cell wall and thought to play a significant role in hyphal growth. The binding of thaumatins to 1,3-GBP affected hyphal growth. These results suggest that thaumatins target 1,3-GBP in order to inhibit hyphal growth of *M. oryzae*. These findings in this project provides significant insights into the plant countermeasure in apoplastic space against fungal pathogens.

研究分野：植物生化学

キーワード：タンパク質間相互作用 アポプラスト 分泌タンパク質 耐病性 OsCBMIP Thaumatin CBM1 1,3-GBP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) いもち病菌はイネの生育および米の収穫量に甚大な被害をもたらす植物病原菌である。イネのみならず農産物の安定した生産を達成するためには、植物病原菌に対して高い抵抗性を有する育成品種の作出が求められている。そのため、植物の耐病性機構や植物病原菌の感染性機構を分子レベルで解明することは重要である。植物のアポプラスト(細胞間隙)は植物と植物病原菌がバトルを行う第一番目の場である。

これまでに、いもち病菌がイネに感染する際にアポプラストに分泌するキシラン分解酵素 (MoCel10A) と結合するイネ由来のタンパク質を Pull-down 法により単離した。このタンパク質は MoCel10A の CBM1 (Carbohydrate binding module family 1) と結合することが明らかとなった。そこでこのイネ由来のタンパク質を OsCBMIP (*Oryza sativa* CBM1 interacting protein) と名付けた。OsCBMIP は DUF26 を 2 つ有する Cysteine-rich repeat secretion protein に属するタンパク質であるが、分子作用については全く未知であった。

(2) OsCBMIP は DUF26 を 2 つ有する分泌タンパク質であるが、植物には DUF26 とキナーゼドメインが融合したタンパク質 (CRK; Cysteine-rich repeat kinase) が存在する。このように共通ドメインを有する分泌型タンパク質とキナーゼ融合型タンパク質を解析したところ、ソーマチン (Thaumatococcus) とソーマチンキナーゼ (Thaumatococcus-kinase) が共通のソーマチンドメインを有する分泌型およびキナーゼ融合型タンパク質として存在することが明らかとなった。そこで、イネ由来のソーマチンと結合するいもち病菌由来のタンパク質を調べた結果、3 種類のタンパク質の単離、同定に成功した。これらいもち病菌由来の 3 種類のタンパク質の機能は全く未知であった。

### 2. 研究の目的

植物病原菌が植物に感染する際、植物の第一の防御機構はアポプラストで生じている。病原菌は多種のタンパク質を植物アポプラストに分泌するのに対して、植物はタンパク質インヒビターやタンパク質分解酵素などを用いて対抗していることが知られている。これまでに、いもち病菌由来のキシラン分解酵素 (MoCel10A) と結合するイネ由来の OsCBMIP の単離に成功していたため、OsCBMIP の分子機構およびいもち病菌に対する耐病性への関与を解明することを本研究の目的とした。さらに、植物アポプラストで作用しているソーマチンとソーマチン結合タンパク質の分子機構についても明らかにすることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質の作製

イネ由来の OsCBMIP およびソーマチンは、イネやベンサミアーナ (*Nicotiana benthamiana*) を宿主として作製した。また、いもち病菌由来の MoCel10A やソーマチン結合タンパク質は、いもち病菌を宿主として作製した。

#### (2) タンパク質間相互作用の解析

イネ由来のタンパク質といもち病菌由来のタンパク質の結合は、共免疫沈降法により解析した。

#### (3) 遺伝子組換え体の作製

イネの遺伝子組換え体は RNAi 法により作製した。また、いもち病菌の遺伝子組換え体は TALEN 法により作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) OsCBMIP の機能解明

##### OsCBMIP の分子機構

OsCBMIP は MoCel10A と結合するタンパク質として単離された。OsCBMIP の結合特異性を調べるため、MoCel10A から CBM1 を除去した MoCel10A を作製した。

OsCBMIP は MoCel10A と結合するが MoCel10A とは結合しないため、OsCBMIP は CBM1 と結合すると結論付けた。OsCBMIP は CBM1 を有する他の酵素 (Cellobiohydrolase や Cellobiose dehydrogenase) とも結合した。MoCel10A は CBM1 を

有するため、セルロースと結合するが、OsCBMIP 存在下ではセルロースと結合することが出来なかった。つまり、OsCBMIP は CBM1 の機能を阻害することにより、酵素活性を阻害していることが示唆された(図1)。いもち病菌のゲノム遺伝子の解析結果より、いもち病菌は14個のCBM1を有するタンパク質を持っている。CBM1の機能を阻害することにより、活性部位に関係なく、CBM1を有する酵素を阻害することが出来ると推察された。

#### OsCBMIPの耐病性への関与

OsCBMIPの作用が耐病性に関与しているかを明らかにするため、OsCBMIPを抑制した*OsCBMIP-Knockdown* イネ株を作製し、いもち病菌の感染性を調べた。その結果、*OsCBMIP*を発現しているコントロール株に比べ、*OsCBMIP-Knockdown* イネ株へのいもち病菌の感染が促進された。この結果より、OsCBMIPはいもち病菌の耐病性に関与していることが示唆された。

#### OsCBMIPの分子進化

Gnk2は銀杏由来のCysteine-rich repeat secretion proteinであり、マンノースと結合することにより抗菌作用を示すことが報告されている(文献1)。そこでOsCBMIPのマンノース結合性を調べたところ、OsCBMIPもマンノースと結合することが明らかとなった。この様にOsCBMIPはCBM1とマンノースに結合する多機能型タンパク質であることが推察された。また、OsCBMIPは2つのDUF26を有するが、どちらのドメインがCBM1との結合に重要であるかを調べたところ、C-末端側のDUF26がCBM1との結合に重要であることが明らかとなった。この結果より、2つのDUF26を有するCysteine-rich repeat secretion proteinはC-末端側のDUF26のアミノ酸配列を変えることにより異なる因子と結合出来るように進化したことが推察された。

文献1 ; Miyakawa, T., et al. A secreted protein with plant-specific cysteine-rich motif functions as a mannose-binding lectin that exhibits antifungal activity. *Plant Physiol.*, 166, 766-778 (2014).

### (2) ソーマチンとソーマチン結合タンパク質の機能解明

#### イネ由来ソーマチンと結合するいもち病菌由来タンパク質の同定

ソーマチンは植物に存在するタンパク質であり、抗菌作用を示すことが知られている。そこでイネ由来ソーマチンと結合するいもち病菌由来のタンパク質をPull-down法により単離した。ソーマチンと結合するタンパク質として、15kDa、24kDa、25kDaの3種類のタンパク質が同定された。15kDaおよび24kDaのタンパク質は分泌タンパク質でありいもち病菌がイネに感染する際、アポプラストに分泌されることが推察された。また、25kDaのタンパク質も分泌タンパク質であるが、細胞壁多糖の $\beta$ -1,3-グルカンに結合していることが明らかとなった。そこで、これらのタンパク質をThBP15k (Thaumatococcus binding protein 15kDa)、ThBP24k (Thaumatococcus binding protein 24kDa)、1,3-GBP (1,3-glucan binding protein) と名付けた。これらは機能未知のタンパク質であった。

#### 1,3-GBPの分子機構

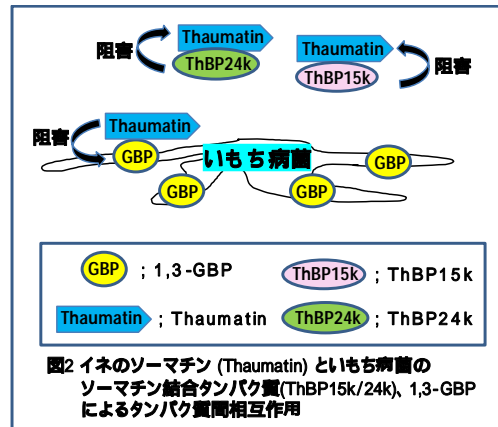
1,3-GBP 遺伝子破壊いもち病菌を作製し、いもち病菌の菌糸成長を調べたところ、菌糸が絡まりあい、正常に伸展していなかった。また、イネへの感染実験の結果、1,3-GBPを発現しているコントロールに比べ、1,3-GBP 遺伝子破壊いもち病菌はイネへの感染が著しく減少した。これらの結果より、1,3-GBPはイネへの感染時の正常な菌糸伸展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### ThBP15kとThBP24kの分子機構

ThBP15kとThBP24kは、いもち病菌がイネに感染する際にアポプラストに分泌されている。また、ThBP15kとThBP24kがイネ由来のソーマチンと結合することにより、ソーマチンの1,3-GBPへの結合が阻害された。この結果より、ThBP15kとThBP24kはソーマチンの機能を阻害するタンパク質であることが示唆された。

## ソーマチンとソーマチン結合タンパク質の相互作用

上述の実験結果より、以下の結論が導かれた。いもち病菌はイネに感染し、菌糸を伸展させる。1,3-GBP は菌糸の伸展に重要な役割を担っている。これに対してイネはソーマチンを分泌し、1,3-GBP と結合することによりその機能を阻害する。さらに、いもち病菌は ThBP15k と ThBP24k を用いてソーマチンと結合し、ソーマチンの 1,3-GBP への結合を阻害している(図2)。この様に、植物アポプラストにおいて、植物と植物病原菌がタンパク質を用いて複雑な攻防を繰り広げている。今後、さらに多種のタンパク質が複雑な相互作用により植物の耐病性および植物病原菌の感染性に大きく関与していることが明らかになっていくであろう。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terauchi et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Applied plant biotechnology for improving resistance to biotic stress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 -	6. 最初と最後の頁 181-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/C2017-0-03484-5	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 多糖結合部位認識タンパク質及びその用途	発明者 竹田匠、その他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6441659	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------