

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19380029

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の分子パターン認識と植物免疫機構の解明

研究課題名（英文） Analysis for recognition of molecular pattern of plant pathogenic fungi and plant immunity

研究代表者

久保 康之（KUBO YASUYUKI）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号 80183797

研究成果の概要：

植物は病原菌の感染を認識し、抵抗性を発揮する。抵抗性には特異的抵抗性遺伝子で支配される植物品種－病原菌レースレベルの抵抗性と病原菌の細胞構造（分子パターン）の認識による基本的抵抗性の2種が存在する。本研究では炭疽病菌、いもち病菌の病原性欠損変異株（*ssd1*変異株）を用い、植物による病原糸状菌の分子認識パターンと防御応答に関する研究を行い、病原菌感染における基本的抵抗性の評価とこれに関わるシグナル伝達経路の解明を行った。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 8,900,000 | 2,670,000 | 11,570,000 |
| 2008年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード： (1) 植物免疫 (2) 分子パターン (3) 防御応答 (4) 基本的抵抗性
(5) 炭疽病菌 (6) いもち病菌 (7) RNAi (8) MAP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

本研究テーマはウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株(*cosssd1*株)に基づくものである。*cosssd1*変異株の変異遺伝子 *CoSSDI* は出芽酵母の *SSDI* 遺伝子のオルソログであり、*SSDI* 遺伝子は酵母において細胞壁の構築に関与する。この遺伝子は出芽酵母の環境ストレスに対する耐性に関与するとともに、免疫細胞であるマクロファージによる認識に関与している。一方、植物病原菌においては細胞壁成分が宿主植物の防御応答を活性化する因子であることが広く知られている。しかしな

がら、細胞壁の構成が変化し、それが病原性に関与する変異株は取得されておらず、*in vivo*での細胞壁成分の機能については未知であった。ウリ類炭疽病菌、およびイネいもち病菌で得られた *ssd1* 変異株は、パピラや活性酸素生成を伴う宿主の速やかな防御応答により感染が抑制されるという特徴を有し、細胞学的所見や生化学的所見から、動物病原性真菌と類似の、宿主に対する高い防御応答誘導活性を有していると考えられた。炭疽病菌といもち病菌の *SSDI* 遺伝子研究は感染場面における植物病原糸状菌のエリシタ

一活性の変化を見出した唯一の実験系であり、植物病原糸状菌の分子パターン認識に関して最初の基盤的研究として位置づけられる。

2. 研究の目的

植物病原糸状菌で感染性に関与する分子パターン変異株はこれまで得られていない。本研究で使用する *ssd1* 変異株により、植物による病原糸状菌の分子認識パターン研究が *in vivo* 実験を含めて可能になった。動物病原性真菌の分子パターン認識は近年、大きく進歩している研究領域であるが、植物病原糸状菌では分子細胞学的には全く着手されておらず、本研究は植物病理学分野において国際的に先駆的位置にある。

動物病原性真菌の分子パターン認識研究の第一人者である Fink 博士（米国、ホワイトヘッド研究所、所長）と動物と植物における病原真菌の細胞壁の分子パターン機能の共通性について意見交換を行い、今後の研究遂行における協同を確認している。これにより植物病原糸状菌における研究を先行的に進め、分子パターン認識研究において国際的にもプライオリティを確立する。植物病原糸状菌が宿主植物の自然免疫系を回避する制御機能を本来的に有しているという新規の概念を日本発で提示、確立することを目的とする。

一方、応用面においてもイネを使った実験系により、植物病原糸状菌の分子パターン認識機構について、受容体の同定、防御応答に至るシグナルカスケードを解明し、病原菌認識機構を改良した耐病性植物育成の基礎的な成果を得る。また、動物病原性真菌の治療剤として注目されている Caspofungin の作用モデルを植物病原菌に適用することにより、病原菌のエリクター活性を高めるという全く新しい概念の防除薬剤の開発の基盤的成果を挙げることができると考える。

3. 研究の方法

- ① *SSD1* 遺伝子の変異株が細胞壁構成に変化をもたらしていることは出芽酵母の *ssd1* 変異株の機能相補や細胞壁結合性蛍光色素に対する感受性などの実験から示唆されており、細胞壁組成がどのように変化しているかを検討する。具体的には糖質の生化学的分析と細胞壁を認識する抗体による免疫顕微鏡観察を行う。
- ② 細胞壁成分を認識する宿主の受容体を解明する。本年、感染決定に与る、いもち病菌のグルカンを認識するレクチンキナーゼとキチンレセプターが相次いで報告されたが、こうした受容体が *ssd1* 変異株の感染性に関与するか、イネとオオムギの RNAi 実験によって検討する。

③ 宿主による分子パターン認識後、どのようなシグナル伝達を経て防御応答に至るかを解明する。ベンサミアナタバコはウリ類炭疽病菌の罹病性宿主である。ベンサミアナタバコとイネの RNAi 実験によってどのようなシグナル伝達系が関与しているかを検討する。

④ 動物病原性真菌では抗生物質 Caspofungin が細胞壁の分子パターンに作用し、宿主認識に与る β グルカン細胞表層に露出させ、宿主の免疫細胞による認識を増大させる効果をもつ。この薬剤を用い、植物病原菌における細胞壁分子パターンの機能について検討する。

4. 研究成果

病原体の細胞表層分子パターンの機能解析

- ① 病原菌の細胞壁の生化学的分析とエリクター活性の評価：いもち病菌および炭疽病菌の細胞壁成分のエリクター活性を評価するために、野生型株と *ssd1* 変異株の可溶性グルカンの抽出と分画を行った。HPLC 分析により、*ssd1* 変異株の可溶性グルカン画分において特異的なピークが検出され、細胞壁成分の変化が確認された。また、炭疽病菌の細胞構造を抗原として作成した数種のモノクローナル抗体により認識活性の差を検討したところ、Mb20 が *cosssd1* 変異株の胞子に対して特異的に認識活性が高いことが明らかとなった。このことから *cosssd1* 変異株が野生型に対して細胞表層構造が変化していることが示された。

植物の防御応答シグナル伝達系解析

- ① RNAi 実験によるベンサミアナタバコの病害応答に関与する遺伝子の同定：ベンサミアナタバコウリ類炭疽病菌系で防御応答に関与する遺伝子として MAPK カスケード遺伝子 (*MEK1*, *MEK2*, *WIPK*, *SIPK*)、NADPH オキシダーゼ遺伝子 (*RbohA*, *RbohB*)、R 遺伝子依存的抵抗性に関与する遺伝子 (*RARI*, *SGTI*) につき、サイレンシング実験を行った結果、*SIPK* と *WIPK* のキナーゼが抵抗性誘導に関与することを RNAi 実験から明らかにした。
- ② RNAi 実験によるオオムギの病害応答に関与する遺伝子の同定：ベンサミアナタバコウリ類炭疽病菌系で得られた結果に基づき、イネ MAP キナーゼオルソログのノックダウン形質転換株を作成することに成功した。また、*mgssd1* 変異株がオオムギに対しても病原性の低下が見られ、それが植物のパピラ形成によるものであることを明らかにした。

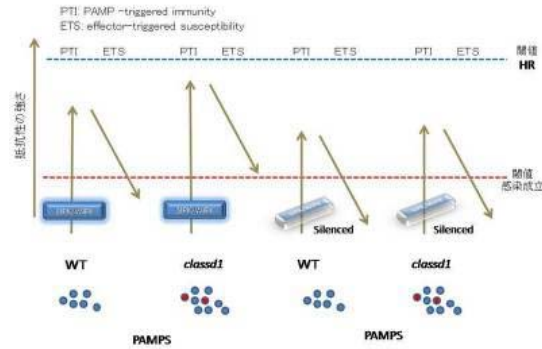
cosd1 変異株による SIPK/WIPK 誘導の評価

① *cosd1* 破壊株に対する SIPK/WIPK を介した植物防御応答活性について評価するため、感染時における SIPK および WIPK のキナーゼ活性を調べた。 *Nicotiana benthamiana* へ接種 3, 6, 12, 24, 48 時間後にタンパク質を回収し、immunocomplex kinase assay を行った。その結果、ウリ類炭疽病菌野生株接種葉では接種 3 時間後に SIPK/WIPK 活性が検出されたがその後活性上昇は認められなかった。これに対し、*cosd1* 破壊株接種葉では接種 3 時間後に活性上昇が認められた後、6 時間後にさらに強い活性が認められた。一方、SIPK/WIPK サイレンシング植物では活性の上昇は見られなかった。このことから、*cosd1* 破壊株は感染時に野生株より強く SIPK/WIPK 活性を誘導し、本破壊株の感染抑制は SIPK/WIPK 活性の上昇に起因することが示唆された。

② SIPK/WIPK 活性誘導が菌表層構造によるものであるかどうか、葉への胞子処理による SIPK/WIPK の活性を調べ評価した。 *Nicotiana benthamiana* 葉へ熱処理により殺菌した胞子懸濁液を注入し immunocomplex kinase assay を行った。その結果、野生株と比較し、*cosd1* 破壊株注入葉では 10, 30 分後の SIPK/WIPK 両活性が顕著に高く検出された。60 分後には、野生株と破壊株の両注入葉においても活性は未処理葉の活性レベルと同程度で検出された。また、野生株が活性抑制能を持つかどうか *cosd1* 破壊株胞子を野生株胞子培養ろ液で懸濁して注入し調べたところ、ろ液を用いなかった場合と比べ活性の差に違いは認められなかった。以上から、*cosd1* 破壊株胞子表層構造は野生株より強く SIPK/WIPK 活性を誘導し、この活性は野生株胞子培養ろ液により抑制されないことが明らかとなった。

Michafungin のウリ類炭疽病菌の感染阻害効果

① 抗生物質 Caspofungin は β グルカン合成阻害活性を有することが動物病原性真菌で明らかにされている。Michafungin (MCFG) は Caspofungin と同系の新規キャンディン系抗真菌薬である。本剤のウリ類炭疽病菌の生育および感染器官の分化に与える影響について検討した。50ng/ml MCFG 含有培地にて野生株の菌糸生育は完全に阻害され、MCFG がウリ類炭疽病菌に対して抗菌作用を示すことが確認された。次に MCFG による菌糸生育の阻害が認められない変異株を自然突然変異により獲得した。野生株および耐性株の



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Shigeyuki Tanaka, Kaori Yamada, Kayo Yabumoto, Satoshi Fujii, Aurélie Huser, Gento Tsuji, Hironori Koga, Koji Dohi, Masashi Mori, Tomonori Shiraishi, Richard O'Connell and Yasuyuki Kubo *Saccharomyces cerevisiae SSD1* orthologs are essential for host infection by the ascomycete plant pathogens *Colletotrichum lagenarium* and *Magnaporthe grisea*.

Molecular Microbiology 64, 1332–1349. (2007) (査読有)

Ayumu Sakaguchi, Toshihiko Miyaji, Gento Tsuji, and Yasuyuki Kubo

Kelch repeat protein Clakel2p and calcium signaling control appressorium development in *Colletotrichum lagenarium*.

Eukaryotic Cell 7, 102–111 (2008) (査読有)

久保康之植物病原糸状菌の形態形成と植物免疫 植物防疫 61 巻 12 号、704–707. (2007) (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

田中茂幸・石濱伸明・吉岡博文・辻 元人・津下誠治・久保康之

ウリ類炭疽病菌 *cosd1* 破壊株胞子の注入処理に対するベンサミアータバコ SIPK/WIPK 活性の評価

2008 年度 日本植物病理学会大会

城岩康太・辻元人・久保康之

新規キャンディン系抗真菌薬 Michafungin (MCFG) はウリ類炭疽病菌の侵入菌糸の伸長を阻害し感染を抑制する

2008 年度 日本植物病理学会大会

田中茂幸・石濱伸明・吉岡博文・辻 元人・
津下誠治・久保康之
ベンサミアータバコにおけるウリ類炭
疽病菌 *cosd1* 破壊株の感染抑制には
SIPK/WIPK の活性化が関与する
2007 年度 日本植物病理学会大会

Shigeyuki Tanaka, Nobuaki Ishihama,
Hirofumi Yoshioka, Gento Tsuji, Seiji
Tsuge and Yasuyuki Kubo
MEK2-SIPK/WIPK cascade of *Nicotiana
benthamiana* is involved in the failure
of infection by *classd1* mutant of
Colletotrichum lagenarium.
2007 XIII International Congress on
Molecular Plant-Microbe Interactions,
Sorrento, Italy

Yasuyuki Kubo, Shigeyuki Tanaka, Ayumu
Sakaguchi Gento Tsuji and Seiji Tsuge
Infection structure development of
Colletotrichum lagenarium and host
defense responses. Fungal Genetics and
Genomics, pp20-22. August 17, 2007,
Seoul National University, Korea

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 康之 (KUBO YASUYUKI)
京都府立大学・
大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号 80183797

(2) 研究分担者

森 正之 (MORI MASASHI)
石川県立大学・生物資源工学研究所・
准教授
研究者番号 00320911

(3) 連携研究者

なし

