

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2011

課題番号：20380027

研究課題名 (和文) 炭疽病菌への非宿主抵抗性に必要な植物因子の研究

研究課題名 (英文) Studies on plant factors required for nonhost resistance against anthracnose fungi.

研究代表者

高野 義孝 (TAKANO YOSHITAKA)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：80293918

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：非宿主抵抗性 炭疽病菌

1. 研究計画の概要

非宿主抵抗性は、植物種生存を根幹で支える種レベルの強固かつ安定な抵抗性である。申請者は、シロイヌナズナと炭疽病菌を用い、非宿主抵抗性を支える分子機構の解明に取り組んでおり、これまでに、シロイヌナズナが細胞死に依存しない侵入阻止型抵抗反応により非宿主炭疽病菌を撃退していることを明らかにしている。さらに、申請者は、この非宿主抵抗性が部分的に崩壊した、独自のシロイヌナズナ変異体 (*lic* 変異体) の分離に成功しており、そのうちの *lic1* 変異体に対するポジショナルクローニング解析により、原因遺伝子である *LIC1* 遺伝子の同定に成功している。申請研究において、(1) *LIC1* 遺伝子がコードする機能未知のタンパク質の生理機能の解明、(2) *LIC1* タンパク質の分子機能の解明、(3) *lic2* 変異体の原因遺伝子の同定および機能解析、(4) *lic1* 変異体を用いた非宿主抵抗性の多層構造解析、を提案する。これらの研究を通じて、非宿主抵抗性に必要な *LIC* 遺伝子の機能を解明するとともに、非宿主抵抗性の多層構造の背景にある分子のアウトラインを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

lic1 変異体における病原菌の感染行動を調査した結果、変異体では病原菌攻撃時における細胞死が誘導されること、さらに、この *lic1* 依存的な細胞死誘導が、サリチル酸経路に依存することを明らかにした。さらに、*pen2* 変異導入によって、*lic1* の表現型が抑制されることを明らかにした。そこで、PEN2 関連抗菌物質を排出すると推定されている ABC トランスポーター遺伝子 *PEN3* の変異を *lic1* 変異体に導入した。その結果、*lic1 pen3* 二重変異体

においては、*lic1* 単独変異体と比較して、さらに壊死斑形成が激しくなることを発見した。この結果より、*lic1* 変異により、PEN2 がその合成に関与する抗菌物質が細胞内に蓄積され、この蓄積が細胞死を誘導する可能性が考えられた。また、*LIC1* と GFP の機能的な融合タンパク質をシロイヌナズナに発現させた結果より、*LIC1* の細胞膜への局在を示唆した。さらに炭疽病菌の新規の感染戦略を発見し、この戦略に対する抵抗性反応において PEN2 経路が重要な役割を果たしていることを発見した。また、*lic2* 変異体についても、原因遺伝子領域を 600 kb にまで狭めることに成功した。一方で、*lic* 表現型を示す新たな遺伝子として、*EDR1* と呼ばれる遺伝子の同定に成功した。*edr1* 変異体に対し、マイクロアレイ解析を実施した結果、ディフェンシンと呼ばれる抗菌タンパク質をコードする遺伝子の発現が、この *edr1* 変異体において著しく低下していることを明らかにした。

3. 現在までの達成度
区分

① 当初の計画以上に進展している。
これまでの研究により、*LIC1* 遺伝子が、非宿主抵抗性時における細胞死を負に制御していることを明らかにし、さらに、PEN2 が生産するグルコシノレート系の代謝物質の処理に関与していることを明らかにしている。さらに、*LIC1* が細胞膜に局在することを明らかにしており、これらの結果により、*LIC1* の生理機能、分子機能に関する理解を大きく推進させた。また、*lic2* 変異体についても、遺伝子同定にむけてのポジショナルクローニングが着実に推進された。さらに、既知の変異体集団に対する *lic* 表現型のスクリ

ーニングにより、EDR1 が炭疽病菌への非宿主抵抗性に必要であることを明らかにした。これらの研究成果は、当初、予定した以上の成果と捉えることができ、特に EDR1 の発見は、非宿主抵抗性の多層構造的な理解を大きく推進させた。これらの研究成果を踏まえて、当初の計画以上に進展しているとした。

4. 今後の研究の推進方策

研究は極めて順調に進展しており、残された研究期間でさらに本研究を進展させていきたい。具体的な推進方策として、まず、*LIC2* 遺伝子の同定をおこなうために、次世代ゲノムシーケンサーによる全配列解析を検討する。また、*LIC1* とそのホモログとの機能重複が見出されているので、*LIC1* とホモログが相互作用しているかを、生化学的手法あるいは酵母ツーハイブリッド法なので調査していく。さらに *lic1* 変異体への代謝解析および代謝関連遺伝子に対する分子遺伝学的解析をおこない、その分子・生理機能をさらに明らかにしていく。欠損すると *Lic* 表現型を示す EDR1 に関してはその細胞内の局在性について明らかにする。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

① Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., and Takano, Y. Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in *Arabidopsis* for nonhost resistance against anthracnose pathogens. *Plant Cell* 22 巻 2429-2443. (2010). 査読有

② 高野義孝 植物病原性カビの感染戦略. *生物の科学 遺伝* 64 巻 20-25. (2010). 査読無

③ 植物病原菌の宿主感染・オルガネラ数の制御とオートファジー. 阪井康能・高野義孝 *ブレインテクノニュース* 第 135 号 25-30. (2009). 査読無

④ Asakura, M., Ninomiya, S., Sugimoto, M., Oku, M., Yamashita, S., Okuno, T., Sakai, Y., and Takano, Y. Atg26-mediated pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Plant Cell* 21 巻 1291-1304. (2009). 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 晝間敬・小野澤真理子・Pawel Bednarek・奥野哲郎・Paul Schulze-Lefert・高野義孝 シロイヌナズナの傷口周辺における不適応

型炭疽病菌の侵入様式の変化 平成 22 年度日本植物病理学会大会 2010.4.18-4.20. 京都国際会館

② 晝間敬・西内巧・加藤智朗・奥野哲郎・高野義孝 EDR1 は非宿主抵抗反応におけるディフェンシンの発現誘導に必要である. 第 51 回日本植物生理学会年会 2010.3.18-2010.3.21. 熊本大学

③ Sogame, M., Onozawa, M., Saitoh, H., Terauchi, R., Okuno, T. and Takano, Y. *LIC1* is involved in cell death regulation during nonhost defense response of *Arabidopsis thaliana*. The XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interaction. July 19-23, 2009, Quebec, Canada.

④ Hiruma, K., Nishiuchi, T., Kato, T., Asano, T., Okuno, T., and Takano, Y. EDR1 positively regulates nonhost defense response independently of PEN2. The XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interaction. July 19-23, 2009, Quebec, Canada.

⑤ 小野澤真理子・十亀美穂・斉藤宏昌・寺内良平・奥野哲郎・高野義孝 *LIC1* 遺伝子は非宿主抵抗反応における細胞死制御に関与している. 平成 21 年度日本植物病理学会大会 2009.3.26-3.28. 山形県生涯学習センター

[図書] (計 1 件)

① **非宿主抵抗性に関与する遺伝子解析.** 高野義孝 植物病理学 (真山滋志、難波成任 編) 228-231. (2010) 査読無