

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15528

研究課題名(和文)植物の病原体由来脂質分子認識機構の解明

研究課題名(英文)Recognition of pathogen-derived sphingolipid in plants.

研究代表者

加藤 大明(KATO, Hiroaki)

京都大学・農学研究科・特定研究員

研究者番号：70642635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物のスフィンゴ脂質認識において、細胞外セラミダーゼNCER2が病原菌セラミドを分解して9-メチルスフィンゴイド塩基を生成し、生成した9-メチルスフィンゴイド塩基を細胞膜上に存在する受容体様キナーゼRDA2が認識することにより抵抗反応を誘導することを明らかにした。シロイヌナズナ rda2 および ncer2 変異体はアブラナ科植物へと病菌に対する抵抗性が低下したことから、RDA2 および NCER2 を介した病原体由来スフィンゴ脂質の認識は植物の抵抗性に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の病原菌に対する防御応答において、病原菌の何をどのように認識しているか不明な点が多い。本研究では、植物が病原菌由来のセラミドを認識するしくみを世界で初めて明らかにした。今後、このしくみを応用した作物の耐病性付与に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, the ceramide *Phytophthora infestans*-Ceramide D (Pi-Cer D) from the plant pathogenic oomycete *P. infestans* triggers defense responses in *Arabidopsis*. Pi-Cer D is cleaved by an *Arabidopsis* apoplastic ceramidase, NEUTRAL CERAMIDASE 2 (NCER2), and the resulting 9-methyl-branched sphingoid base is recognized by a plasma membrane lectin receptor-like kinase, RESISTANT TO DFPM-INHIBITION OF ABSCISIC ACID SIGNALING 2 (RDA2). 9-Methyl-branched sphingoid base is unique to microbes and induces plant immune responses by physically interacting with RDA2. Loss of RDA2 or NCER2 function compromised *Arabidopsis* resistance against an oomycete pathogen. Thus, we elucidated the recognition mechanisms of pathogen-derived lipid molecules in plants

研究分野：植物病理学

キーワード：シロイヌナズナ スフィンゴ脂質 ジャガイモ疫病菌 卵菌 受容体 セラミダーゼ Lumi-Map

## 1. 研究開始当初の背景

植物は微生物を構成する成分を分子パターンとして認識し、防御応答に必要な遺伝子を活性化させ、感染から身を守っている。しかしながら、微生物のどの分子を、どのように認識しているか未解明な状況である。Pi-Cer D はジャガイモ疫病菌より単離された新奇セラミド関連化合物であり、植物側の Pi-Cer D 認識機構は全く未解明である。また、植物の脂質分子の認識機構についても報告例が極めて少ない。本研究において、シロイヌナズナの Pi-Cer D 受容体および認識機構が解明できた場合、植物の脂質認識機構に新しい知見を与える点で、学術的独創性は極めて高いと言える。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物の病原菌由来のスフィンゴ脂質 Pi-Cer D の認識機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、病原性卵菌類由来のセラミド関連化合物 Pi-Cer D に対する植物の受容体および情報伝達に必要な因子を単離するため、生物発光レポーターにより表現型解析と全ゲノムシーケンス技術 MutMap を組み合わせた Lumi-Map 法を用いて Pi-Cer D 応答変異体および原因遺伝子を同定し、それら因子の機能解析を行った。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナ *WRKY33* 遺伝子のプロモーターを活用し、*WRKY33-LUC* レポーター植物を作成した。*WRKY33-LUC* レポーター植物に Pi-Cer D を処理したところ、一過的な生物発光応答を誘導したことから、シロイヌナズナにおいても Pi-Cer D を認識することが確認できた。*WRKY33-LUC* レポーター植物種子に EMS 処理を行い、M1 種子を作製した。M1 種子をばらばらにし、収穫した M2 種子を *WRKY33-LUC* レポーター植物変異体集団として、Pi-Cer D 処理に対する生物発光応答を指標とした変異体スクリーニングに用いた。M2 植物約 10,000 個体をスクリーニングし、Pi-Cer D 処理に対して無応答となる変異体を 9 系統、Pi-Cer D 処理に対して低発光応答を示す個体を 2 系統単離した。*WRKY33-LUC* レポーター植物の野生株は病原細菌の鞭毛タンパク質由来のペプチドである *flg22*、翻訳制御因子 EF-Tu 由来のペプチドである *elf18*、真菌の細胞壁を構成する糖であるキチンといった微生物由来の分子を処理すると生物発光応答を示す。得られた Pi-Cer D 無応答変異体および Pi-Cer D 低応答変異体に対し、*flg22*、*elf18*、キチンを処理したところ野生株と同様の生物発光応答を示したことから、これらの Pi-Cer D 無応答変異体および Pi-Cer D 低応答変異体の原因遺伝子は植物の Pi-Cer D 認識に特異的に機能する遺伝子であることが推定された。Pi-Cer D 無応答変異体および Pi-Cer D 低応答変異体の原因遺伝子の特定に MutMap 法を用いた。Pi-Cer D 無応答変異体および Pi-Cer D 低応答変異体と野生株である *WRKY33-LUC* レポーター植物を交配し、F1 種子を得た。F1 種子を培養し、F2 種子を得た。得られたそれぞれの F2 集団に対して Pi-Cer D 処理を行い、生物発光解析による表現型調査を行い、変異体型の表現型を示す F2 個体 30 系統を選抜した。選抜した 30 系統の F2 個体を培養し、等量の組織をサンプリングしたのち、バルク DNA を調製した。次世代シーケンス解析を実施し、シーケンスリードを得た。得られたシーケンスリードを *WRKY33-LUC* レポーター植物の野生株のリファレンスリードに対してアライメントし、検出された SNPs が *WRKY33-LUC* レポーター植物の野生株と異なる領域および本領域において変異を持つ候補遺伝子のリストを得た。

9 系統の Pi-Cer D 無応答変異体はいずれもシロイヌナズナ 1 番染色体に共通した候補領域を見出し、各変異体の候補遺伝子リストの中にレクチンレセプターキナーゼ *RDA2*(resistant to DFPM inhibition of ABA signaling 2) が共通して含まれた。Pi-Cer D 無応答変異体に対して *RDA2* を含むゲノム領域を形質転換により導入したところ、Pi-Cer D に対する応答性が回復したことから、Pi-Cer D 無応答変異体の原因遺伝子が *RDA2* であることを証明した。

一方、2 系統の Pi-Cer D 低応答変異体はいずれもシロイヌナズナ 2 番染色体に共通した候補領域を見出し、各変異体の候補遺伝子リストの中に *neutral ceramidase2* (*NCER2*) が共通して含まれた。Pi-Cer D 低応答変異体に対して *NCER2* を含むゲノム領域を形質転換により導入したところ、Pi-Cer D に対する応答性が回復したことから、Pi-Cer D 低応答変異体の原因遺伝子が *NCER2* であることを示した。

次に、*RDA2* および *NCER2* が植物の病害抵抗性に関与するか調査した。シロイヌナズナ *rda2* および *ncer2* 変異体にシロイヌナズナに対して病原性を示すアブラナ科植物バト病菌 (*Hyaloperonospora arabidopsidis* WACO9) を接種し、形成された胞子数を計数したところ、*rda2* および *ncer2* 変異体において野生株よりも多くの胞子が形成された。この結果は、*RDA2* および *NCER2* を介した病原菌由来のセラミド認識機構が植物の病害抵抗性に貢献していることを意味している。

単離した NCER2 のタンパク質構造にはシグナルペプチドが推定された。これまでの試験において、植物に Pi-Cer D を外から処理をして植物の応答が認められたことから、Pi-Cer D が植物の細胞外において NCER2 により分解され、生じた産物が抵抗反応を誘導する可能性が考えられた。そこで、NCER2 の細胞外への局在および、Pi-Cer D 分解活性について調査した。

シロイヌナズナ *ncer2* 変異体に対して、HA タグ融合 NCER2 を発現する形質転換植物を作製し、アポプラスト画分におけるウェスタンブロット解析の結果から NCER2 が植物のアポプラストに存在することを確認した。次に Pi-Cer D と NCER2 を混合した後に回収した画分に対する HPLC 解析により、Pi-Cer D が NCER2 により分解されることおよび分解産物の中に 9-メチル構造を持つスフィンゴイド塩基が検出された。さらに Pi-Cer D が NCER2 により分解されスフィンゴイド塩基が生成する工程が植物の細胞外で行われていることを証明するために、液体培地で生育させたシロイヌナズナ実生に Pi-Cer D を処理したのち液体培地を回収し、培地中のスフィンゴイド塩基の検出を試みた。野生型植物の培地においては Pi-Cer D 由来の 9-メチルスフィンゴイド塩基が認められたのに対し、*ncer2* 変異体の培地では認められなかった。本結果は、Pi-Cer D が植物の細胞外において NCER2 により分解され、9-メチルスフィンゴイド塩基が生成したことを示している。

次に 9-メチルスフィンゴイド塩基を合成し、シロイヌナズナに処理したところ *WRKY33* 遺伝子の発現上昇、活性酸素生成、MAPK 活性化などの種々の抵抗反応を誘導した。スフィンゴイド塩基は真核生物に保存される脂質であるが、9-メチル分枝を持つスフィンゴイド塩基は糸状菌や卵菌に認められ、植物には存在しないため、植物にとって非自己の分子である。9-メチルスフィンゴイド塩基 (9-methyl-4-trans,8trans-sphingadienine) は他のスフィンゴイド塩基 (sphingadienine, sphingosine) と比較して植物に対する高い抵抗反応誘導活性を示した。これらの結果は、Pi-Cer D が植物の細胞外セラミダーゼにより分解され、生成した 9-メチルスフィンゴイド塩基が RDA2 を介した抵抗反応誘導の活性の本体であることを示している。

次に、スフィンゴイド塩基に対する RDA2 細胞外領域の結合能について評価した。RDA2 の細胞外ドメインをカイコ体液中に発現し、回収したカイコ体液中から RDA2 細胞外ドメインをタグ精製により精製し、スフィンゴイド塩基との結合能を評価した。Thermal shift assay および SPR 解析の両方において、RDA2 とスフィンゴイド塩基が直接結合することが示された。また、RDA2 の細胞外ドメインは、スフィンゴイド塩基の前駆体である Pi-Cer D とは結合しなかった。一方、スクリーニングにより得られた *rda2* 変異体の 1 系統に認められた細胞外のレクチンドメインにアミノ酸置換をもつタンパク質 (*RDA2* 変異体の細胞外ドメイン) においてはスフィンゴイド塩基との結合は認められなかった。これらの結果より、RDA2 が植物のスフィンゴイド塩基の受容体であることを証明した。本研究の結果、植物のスフィンゴ脂質認識機構が世界で初めて明らかとなった (図 1)。

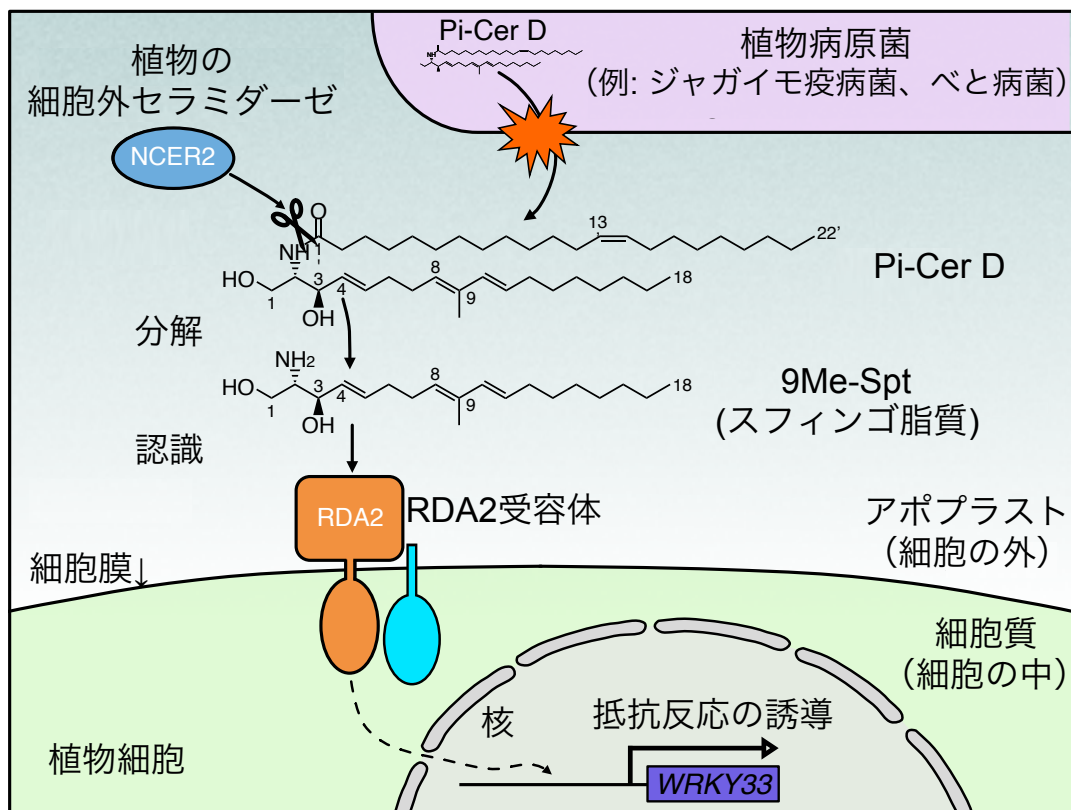


図 1. 植物の病原菌由来スフィンゴイド塩基認識機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato H., Nemoto K., Shimizu M., Abe A., Asai S., Ishihama N., Daimon T., Ojika M., Kawakita K., Onai K., Shirasu K., Ishiura M., Takemoto D., Takano Y., Terauchi R.	4. 巻 0
2. 論文標題 Pathogen-derived 9-methyl sphingoid base is perceived by a lectin receptor kinase in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.10.18.464766	査読の有無 無
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 Kato H., Nemoto K., Shimizu M., Abe A., Asai S., Ishihama N., Matsuoka S., Daimon T., Ojika M., Kawakita K., Onai K., Shirasu K., Yoshida M., Ishiura M., Takemoto D., Takano Y., Terauchi R.	4. 巻 376
2. 論文標題 Recognition of pathogen-derived sphingolipids in <i>Arabidopsis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 857 ~ 860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abn0650	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤大明・根元圭一郎・清水元樹・阿部陽・浅井秀太・石濱伸明・松岡聖二・大門高明・小鹿一・川北一人・小内清・白須賢・吉田稔・石浦正寛・竹本大吾・高野義孝・寺内良平
2. 発表標題 植物の病原菌由来9-メチルスフィンゴイド塩基の認識機構の解明
3. 学会等名 令和4年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------