

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21320

研究課題名（和文）植物に耐病性を付与する病原菌エフェクタートラップ法の開発

研究課題名（英文）Pathogen effector trap system that increases disease resistance in plants

研究代表者

川崎 努（Kawasaki, Tsutomu）

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：90283936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：作物に重要病害を引き起こすキサントモナス属の病原菌は、多数のTALエフェクターを植物細胞内に分泌する。TALエフェクターは、転写因子として宿主遺伝子の転写を制御することができる、病原力の鍵因子である。そのため、TALエフェクターの機能抑制により重要病害を克服できると考えられる。イネNB-LRR型受容体Xa1がもつccBEDドメインが、TALエフェクターと相互作用することが明らかになった。そこで、TALエフェクターをトラップするため、ccBEDドメインを過剰発現するイネを作出した。しかし、ccBEDは核でTALエフェクターと相互作用するものの、転写因子としての機能を阻害しないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な環境変動により、病害虫の発生地域が変化・拡大することで、農業生産に大きな損失をもたらしている。また、環境保全の観点から、病原菌を殺すのではなく、病原菌の病原力を抑制する技術の開発が望まれる。キサントモナス属の病原菌は、多くの重要病害を引き起こすことが知られている。キサントモナスの病原菌がもつTALエフェクターは、病原力の鍵因子であるため、TALエフェクターの機能を抑制する技術を開発できれば、次世代の耐病性技術として非常に有効であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Xanthomonas spp. cause a variety of diseases in economically important crops. The pathogens secrete a large number of TAL effectors into plant cells. TAL effectors function as the transcription factor in host cells. Therefore, TAL effectors are most important virulence factors. Thus, it seems that suppression of TAL effectors may result in enhancement of disease resistance in host plants. We found that the ccBED domain of rice NB-LRR receptor Xa1 interacts with TAL effectors. To inhibit the function of TAL effectors, we generated transgenic rice plants over-expressing the ccBED domain. Although nuclear interaction between the ccBED domain and the TAL effector was observed, the ccBED domain did not inhibit the transcriptional activities of the TAL effectors.

研究分野：植物免疫学

キーワード：エフェクター イネ 病原力

1. 研究開始当初の背景

植物は、細胞膜上に存在する病原菌認識受容体で、病原菌の構成成分を分子パターンとして認識して、迅速に多様な防御反応を誘導する。一方、病原菌は、宿主の免疫反応を阻止するために、「エフェクター」と総称される病原力因子を宿主細胞内に分泌する。エフェクターは、効率的に宿主の免疫応答を抑制するため、免疫誘導の起点となる受容体やその周辺に存在する因子、あるいは信号伝達に関わる主要因子の機能や活性を阻害することが知られている。また、一部のエフェクターは転写因子として、宿主の遺伝子発現を制御することで、病原菌の増殖に有利な栄養環境を作り出している。このように、エフェクターは病原力の根源であり、エフェクターの機能を阻害できれば、病原菌の感染力は非常に低下し、作物の病害を抑制できると期待できる。しかし、エフェクター機能を阻害するという観点での耐病性研究は、これまでに進んでいない。

2. 研究の目的

病原菌のエフェクターは、病原力の鍵因子である。そこで、エフェクターの機能を抑制することで、病原菌の感染力を弱体化する次世代型の耐病性技術の開発を行う。本研究では、イネと白葉枯病菌の相互作用をモデルシステムとして用いる。白葉枯病菌は、約20個の Transcriptional Activator-like (TAL) エフェクターをもち、それらが病原力において非常に重要な働きをしている。これまでの解析により、イネNB-LRR型受容体Xa1がもつccBEDドメインがTALエフェクターと相互作用することが明らかになった。そこで、本研究では、TALエフェクターが結合するccBEDドメインを利用し、全てのTALエフェクターを同時に抑制する技術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) イネの形質転換体の作製

ccBEDドメインを過剰発現させるためのコンストラクトをアグロバクテリウムに導入し、イネカルスに感染させた。ハイグロマイシン耐性を指標にして、形質転換細胞を選抜し、再生培地により形質転換植物を得た。

(2) タンパク質間相互作用の解析

細胞内におけるタンパク質間相互作用を解析するため、Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)法およびSplit NanoLuc Luciferase complementation (SNLC)法を用いた。BiFC解析には、VENUS 蛍光タンパク質をN末端側とC末端側に分けたコンストラクトを用い、イネプロトプラストで一過的に発現させ、蛍光顕微鏡を用いて解析した。SNLC法では、NanoLuc ルシフェラーゼをLarge BitとSmall Bitに分けたコンストラクトを用い、ルシフェラーゼ活性の測定にはプレートリーダーを用いた。酵母 Two Hybrid法には、LexAとVP16を用いた実験系を使用した。

(3) 白葉枯病抵抗性の解析

白葉枯病菌の懸濁液を、イネ葉にシリンジで注入し、2日後あるいは4日後の菌の増殖量を解析した。菌の増殖を定量的に解析するために、接種部位からDNAを調製し、リアルタイムPCRを用いて、イネのゲノムDNAに対する白葉枯病菌のゲノムDNAの量を解析した。さらに、剪葉接種により白葉枯病菌を感染させ、病斑の伸展を解析した。

(4) 転写活性の解析

解析するプロモーターにルシフェラーゼのコード領域を連結することで、レポーターコンストラクトを作製した。エフェクターの発現には、CaMV35Sプロモーターやユビキチンプロモーターを利用したコンストラクトを用いた。イネプロトプラストに、エフェクターとレポーターのこ

ンストラクトを導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することで、転写量を解析した。

4. 研究成果

(1) TAL エフェクターと ccBED ドメインの相互作用

白葉枯病菌に対する抵抗性を誘導するイネ NB-LRR 受容体 Xa1 は、白葉枯病菌がイネの細胞内に分泌する TAL エフェクターを認識することが知られている。白葉枯病菌は、20 個程度の TAL エフェクターを持っているが、TAL エフェクター間でアミノ酸配列は高度に保存されており、Xa1 は全ての TAL エフェクターを認識すると考えられる。Xa1 がもつ ccBED ドメイン、NB ドメイン、LRR ドメインの各ドメインについて、TAL エフェクターである AvrXa7 と Xoo1132 との相互作用を行った。各ドメインと TAL エフェクターをイネプロトプラストで一過的に発現させ、SNLC 解析を行った。その結果、ccBED ドメインが、TAL エフェクターと相互作用することが明らかになった (図 1)。

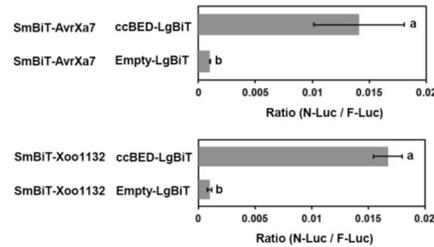


図 1. SNLC法を用いてccBEDドメインとTALエフェクターの相互作用解析

ccBED ドメインと TAL エフェクターに GFP を融合させたタンパク質を発現させるコンストラクトを作製し、イネプロトプラストで一過的に発現させた。その結果、ccBED ドメインと TAL エフェクターは核に局在することが明らかになった。このことから、ccBED ドメインは核に移行する活性を持っていると考えられるが、ccBED に存在する核移行シグナルを特定することができなかった。BiFC 法を用いて、ccBED と TAL エフェクターの相互作用の解析を行ったところ、両タンパク質は核で相互作用していることが明らかになった。さらに、TAL エフェクターを N 末端領域と C 末端領域に分け、ccBED の相互作用解析を行ったところ、ccBED は、TAL エフェクターの C 末端領域と相互作用していることが明らかになった。TAL エフェクターのアミノ酸配列は高度に保存されているため、ccBED ドメインを過剰発現させることで、全ての TAL エフェクターを阻害できる可能性が示唆された。

酵母 Two Hybrid 法を用いて、ccBED と TAL エフェクターの相互作用を解析した。しかし、相互作用は検出されなかった。そのため、ccBED と TAL エフェクターの相互作用には、イネ細胞に存在する何かの因子が必要である可能性が示唆された。

(2) ccBED 過剰発現イネの作成と解析

CaMV35S プロモーターを用いて、ccBED ドメインを過剰発現するイネ系統を 5 系統作出した。併せて、ccBED に GFP を融合させたタンパク質を発現する系統も作出した。これらの系統に、剪葉接種法および葉へのインフィルトレーション法により、白葉枯病菌を感染させ、病斑の伸展および菌の増殖量を解析した。本実験において、ccBED の過剰発現により、白葉枯病菌の増殖が抑制されることを期待したが、菌の増殖量は、野生型と同じであった。

(3) ccBED ドメインが TAL エフェクターの転写活性に与える影響

TAL エフェクターである AvrXa7 は、イネの SWEET14 遺伝子のプロモーターに結合し、強制的に転写を誘導することが知られている。そこで、AvrXa7 の標的配列を含む SWEET14 遺伝子のプロモーターを単離し、ルシフェラーゼ遺伝子と連結してレポーター遺伝子を作製した。AvrXa7 とレポーター遺伝子のコンストラクトをイネプロトプラストに導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することで、AvrXa7 による転写活性を測定できた。この実験系で、ccBED ドメインを共発現させたが、AvrXa7 の転写活性への影響は見られなかった。BiFC 解析や SNLC 解析の結果から、ccBED ドメインは、AvrXa7 と相互作用していると考えられるが、AvrXa7 を阻害する活性がないことが示唆された。このことが、ccBED 過剰発現イネにおいて、白葉枯病抵抗性が向上しなかった原因ではないかと考えられる。ccBED ドメインは、核において TAL エフェクターと相互作用することができるため、ccBED ドメインに TAL エフェクターの活性を阻害する機能ドメインを融合できれば、その過剰発現により白葉枯病菌に対する抵抗性を向上できるのではないかと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshihisa Ayaka, Yoshimura Satomi, Shimizu Motoki, Sato Sayaka, Matsuno Shogo, Mine Akira, Yamaguchi Koji, Kawasaki Tsutomu	4. 巻 236
2. 論文標題 The rice OsERF101 transcription factor regulates the NLR Xa1 mediated immunity induced by perception of TAL effectors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1441 ~ 1454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.18439	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 Ichimaru Kota, Yamaguchi Koji, Harada Kenichi, Nishio Yusaku, Hori Momoka, Ishikawa Kazuya, Inoue Haruhiko, Shigeta Shusuke, Inoue Kento, Shimada Keita, Yoshimura Satomi, Takeda Takumi, Yamashita Eiki, Fujiwara Toshimichi, Nakagawa Atsushi, Kojima Chojiro, Kawasaki Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Cooperative regulation of PBI1 and MAPKs controls WRKY45 transcription factor in rice immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30131-y	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 Yoshihisa Ayaka, Yoshimura Satomi, Shimizu Motoki, Yamaguchi Koji, Kawasaki Tsutomu	4. 巻 87
2. 論文標題 Identification of TAL and iTAL effectors in Japanese strain T7133 of Xanthomonas oryzae pv. oryzae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 354 ~ 360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-021-01023-8	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15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉久采花、佐藤 颯花、吉村智美、清水元樹、山口公志、川崎努
2. 発表標題 核局在型NLRであるXa1に依存した免疫誘導機構の解明
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村春平、堀百香、西村直也、吉村智美、山口公志、峠隆之、川崎努
2. 発表標題 イネの免疫誘導におけるPUB44の活性化機構の解明
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉久采花、吉村智美、清水元樹、山口公志、川崎努
2. 発表標題 イネNB-LRR型受容体Xa1の複合体形成と免疫活性化機構の解明に向けて
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 颯花、吉久采花、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 白葉枯病菌のiITALエフェクターによるXa1依存型抵抗性の阻害機構の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀百香、西村直也、中村春平、西尾優作、山口公志、吉村智美、峠隆之、川崎努
2. 発表標題 イネ免疫応答におけるMAPKによるPUB44の制御機構
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川隼平、吉久采花、吉村智美、山口公志、津下誠治、川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌のTALエフェクターXoo1996を介した感染機構の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田朋輝, 山本剛大, 山口公志, 吉村智美, 川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌エフェクターXopZによるOsZIP3を介したイネ免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤颯花・吉久采花・山口公志・吉村智美・川崎努
2. 発表標題 白葉枯病菌のiTALエフェクターによるXa1抵抗性阻害機構の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野晏奈、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 イネ白葉枯病菌のTALエフェクターによる宿主遺伝子の転写誘導機構
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋田啓太、一丸航太、繁田修佑、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 イネ免疫応答におけるPBI1とMAPKによるWRKY45の活性化制御機構
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西尾優作、一丸航太、繁田修佑、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 イネ免疫応答におけるPUB44活性化機構
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉久采花、小川隼平、佐藤 颯花、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 Xa1を介したイネ白葉枯病の抵抗性機構の解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸田智花、山口公志、山口暢俊、津田賢一、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 病原菌感染時のMAPKカスケードの活性化に伴うAG04のエピゲノム制御機構の解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾谷卓海、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 アブラナ科黒腐病菌エフェクターXopZによる宿主標的因子を介した免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉久采花、小川隼平、佐藤 颯花、山口公志、吉村智美、川崎努
2. 発表標題 Xa1を介したイネ白葉枯病の抵抗性機構
3. 学会等名 令和3年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学農学部 生物機能科学科 植物分子遺伝学研究室 https://www.nara.kindai.ac.jp/laboratory/kawasaki_lab/index.html

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
---------	---------