

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380031

研究課題名（和文）植物表層における病原糸状菌の分子パターン認識機構とシグナルネットワークの解明

研究課題名（英文）Analysis on the recognition mechanisms of molecular pattern of plant pathogenic fungi and signaling network

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（和文）：本研究では、病原糸状菌の感染に対する植物の基本的抵抗性の実体解明を目的として、植物の病害応答性の強度に関連する炭疽病菌、およびいもち病菌の分子パターン変異株(*ssd1* 株)を用い、病原菌の表層構造の変化と植物細胞表層における防御応答に関する認識とシグナル伝達に関する研究を進めた。とくに、イネ-いもち病菌系、シロイヌナズナ-炭疽病菌系における、ゲノム科学的アプローチにより分子パターン認識の下流で進行するシグナルネットワークに関する研究を進め、耐病性に重要な転写因子の同定とイネいもち病菌に対する耐病性を示すトランスジェニック植物を作出した。

研究成果の概要（英文）：In this research project, to elucidate plant basal resistance mechanisms against plant pathogenic fungi, modification of cell surface structure of pathogen and its involvement of recognition and signaling network leading to plant defense response was analyzed. Especially, using rice-rice blast fungus and *Arabidopsis thaliana* – anthracnose fungus system, signaling network downstream of pathogen recognition was extensively analyzed based on genome based approach. Manipulation of pivotal transcription factor involving disease resistance enabled us to generate disease resistant transgenic rice plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
22 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
23 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード： (1) 植物 (2) 微生物 (3) PAMPs (4) バイオテクノロジー
(5) 炭疽病菌 (6) いもち病菌 (7) マイクロアレイ (8) 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

申請者は病原糸状菌の病原性に関する分子遺伝学的解析を進めてきた。アグロバクテ

リウムを用いた形質転換法により取得したウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株から病原性遺伝子 *CoSSD1* を同定した。本遺伝子は

出芽酵母において細胞壁の構築に関与する *SSD1* 遺伝子オルソログであり、*ssd1* 変異株は動物細胞系で、マクロファージの免疫活性を増大させる。一方、ウリ類炭疽病菌、イネいもち病菌の *ssd1* 変異株(*cosssd1*, *mgssd1*) 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その感染が抑制され、細胞学的、生化学的所見から宿主に対する高い防御応答誘導活性を有していることを明らかにしている。

また、炭疽病菌とベンサミアータタバコを用いた防御応答関連遺伝子のサイレンシング実験により WIPK/SIPK MAP キナーゼカスケードが基本的抵抗性と *cosssd1* 変異株の感染抑制に関与していること、さらに、*cosssd1* 変異株は細胞壁組成が変化し、野生型株に比較して強い WIPK/SIPK MAP キナーゼの活性誘導を示すこと、また、MAP キナーゼ活性の経時的な測定から宿主による病原菌の認識が感染過程の病原菌の侵入前の初期過程の植物表層で行われていることを明らかにしている。

また、この現象の普遍性を評価するために、オオムギの BSMV を用いた遺伝子サイレンシング実験を進め、いもち病菌の *mgssd1* 変異株の感染の可否に一義的に関与するオオムギの MEK キナーゼ遺伝子の存在を明らかにし、いもち病菌感染におけるベンサミアータタバコと共通した防御応答基盤の存在を確認した。一方、シロイヌナズナを宿主とするアブラナ科植物炭疽病菌を用いた *ssd1* 変異株(*chssd1*)の作出により、シロイヌナズナの防御応答変異株を用いた遺伝学的解析の基盤整備を行っている。

2. 研究の目的

病原菌-植物の相互作用による植物の防御応答には遺伝子対遺伝子説に基づく非病原力(*avr*)遺伝子と抵抗性(*R*)遺伝子による特異性の高い抵抗性と病原菌の細胞構造(分子パターン)の認識に基づく基本的抵抗性がある。

本研究は、病原糸状菌の感染に対する植物の基本的抵抗性の実体解明を目的として、植物の病害応答性が変化する炭疽病菌、およびいもち病菌の分子パターン変異株を用い、植物細胞表層における分子パターン認識の分子機序と防御応答に関する研究を飛躍的に進めることを目的とする。特に、イネ-いもち病菌系、シロイヌナズナ-炭疽病菌系の展開により、ゲノム科学的アプローチにより分子パターン認識の下流で進行するシグナルネットワークを解明し、耐病性植物作成の基盤的研究成果の獲得をめざす。

3. 研究の方法

①病原菌の防御応答誘導因子の解明

炭疽病菌、いもち病菌の *ssd1* 遺伝子変異株の生化学的解析を進め、防御応答を誘導する分子を同定する。さらに、炭疽病菌、いもち病菌のプロテオーム解析により *SSD1* 遺伝子下流で制御されているタンパク質をコードする遺伝子の機能解析を行う。

②植物の基本的抵抗性に関わるシグナルネットワークの解明

宿主においてエリシターの分子パターン認識後、どのようなシグナルネットワークを介して防御応答に至るかをシロイヌナズナの変異体に対する感染性の評価および *ssd1* 変異株いもち病菌接種イネの DNA アレイ解析により解明する。

③耐病性トランスジェニック植物の作成

基本的抵抗性に関与する遺伝子の改変による耐病性トランスジェニック植物を作成し、耐病性の機能評価を行う。

4. 研究成果

①病原菌の防御応答誘導因子の解明

炭疽病菌、いもち病菌の *ssd1* 遺伝子変異株の生化学的解析を進め、細胞壁多糖成分の調整、生理活性解析を行った。さらに、炭疽病菌、いもち病菌のプロテオーム、グリコプロテオーム解析により *SSD1* 遺伝子下流で制御されている候補タンパク質の同定に成功した。

②植物の基本的抵抗性に関わるシグナルネットワークの解明

防御応答やストレス応答に関わるシロイヌナズナ変異体のアブラナ科植物炭疽病菌に対する感受性を検討した結果、タンパク質のフォールディングに関わる *psl* 系統と花成に関わる転写因子 *voz1voz2* 二重変異体において顕著な感染拡大が認められた。次に、アブラナ科植物炭疽病菌に対する抵抗性と病原細菌に対する植物防御応答経路の関連について調べるために、MAMPs(*elf18*, *flg22*)を含んだ孢子懸濁液による混合接種を行った。その結果、MAMPs の処理により、アブラナ科植物炭疽病菌の感染が抑制された。

MAMPs 認識による防御応答経路の活性化は、高濃度スクロース条件下で培養されたシロイヌナズナ変異体において生じるアントシアニン蓄積の抑制によって評価することができる。そこで、この実験系によりアブラナ科植物炭疽病菌における植物防御応答誘導因子について検討した。出芽酵母、ウリ類炭疽病菌、イネいもち病菌、アブラナ科植物炭疽病菌由来の可溶性グルカン画分を推定 MAMPs として、防御応答誘導能について評価した。その結果、アブラナ科植物炭疽病菌野生株由来の可溶性グルカン画分において

顕著な防御応答誘導能が認められたが、*psl* 変異体ではその防御応答誘導能が部分的に損なわれていた。

また、イネいもち病菌の *mgssd1* 変異株、とエクトピック変異株を接種したイネの DNA アレイ解析を行った。エクトピック変異株と比較して、*mgssd1* 変異株で発現が2倍以上あるいは0.5倍以下に発現が変動している遺伝子の同定を行った。接種後6時間では、*mgssd1* 変異株で発現が上昇している遺伝子にキチナーゼ等が多く見られ、減少している遺伝子に光合成関連遺伝子が多く見られた。

③耐病性トランスジニック植物の作成

基本的抵抗性に関与する遺伝子としてシロイヌナズナ変異株と *ssd1* 変異株を用いた感染系で *VOZ1*、*VOZ2* が基礎的抵抗性に強く関与していることが明らかになった。この実験結果にもとづき、抵抗性に関与すると推定される転写因子の過剰発現イネ形質転換体とサイレンシング株を作出し、イネいもち病菌を接種したところ、過剰発現体は抵抗性を増強し、サイレンシング株は感受性が高まる傾向が顕著であり、本遺伝子の改変による耐病性植物作出の可能性を得ることができた。

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 10 件)

- 1) Tanaka, S., Ichikawa, A., Yamada, K., Tsuji, G., Nishiuchi, T., Mori, M., Koga, H., Nishizawa, Y., O'Connell, R., and Kubo, Y. (2010) *HvCEBiP*, a gene homologous to rice chitin receptor *CEBiP*, contributes to basal resistance of barley to *Magnaporthe oryzae*. **BMC Plant Biology** 10: 288. (査読有)
- 2) Sakaguchi, A., Tsuji, G., and Kubo, Y. (2010) A yeast *STE11* homologue *CoMEKK1* is essential for pathogenesis-related morphogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23:1563-1572. (査読有)
- 3) Fujihara, N., Sakaguchi, A., Tanaka, S., Fujii, S., Tsuji, G., Shiraishi, T., O'Connell, R., and Kubo, Y. (2010) Peroxisome biogenesis factor PEX13 is required for appressorium-mediated plant infection by the anthracnose fungus, *Colletotrichum orbiculare*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23: 436-445. (査読有)
- 4) Sakaguchi, A., Miyaji, T., Tsuji, G., and Kubo, Y. (2010) A Kelch repeat protein Cokellp associates with microtubules and is involved in appressorium development in *Colletotrichum orbiculare*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23: 103-111. (査読有)
- 5) Ushimaru, T., Terada, H., Tsuboi, K., Kogou, Y., Sakaguchi, A., Tsuji G., and Kubo, Y. (2010) Development of an efficient gene targeting system in *Colletotrichum higginsianum* using a non-homologous end-joining mutant and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. **Molecular Genetics and Genomics** 284:357-371. (査読有)
- 6) Kubo, Y., and Tanaka, S. (2010) Pathogenesis and plant basal resistance in *Colletotrichum orbiculare* and *Magnaporthe oryzae* infection. In **Genome-Enabled Integration of Research in Plant Pathogen Systems**. (Wolpert, T., Shiraishi, T., Allen, C., Glazebrook, J. and Akimitsu, K. eds), APS Press, pp 101-110. (査読無)
- 7) Damm, U., Baroncelli, R., Cai, L., Kubo, Y., O'Connell, R., Weir, B., Yoshino K., and Cannon P. (2010) *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. **IMA Fungus** 1: 161-165. (査読有)
- 8) Tanaka, S., Ishihama, N., Yoshioka, H., Huser, A., O'Connell, R., Tsuji, G., Tsuge, S., and Kubo, Y. (2009) The *Colletotrichum orbiculare ssd1* mutant enhances *Nicotiana benthamiana* basal resistance by activating a mitogen-activated protein kinase pathway. **Plant Cell** 21:2517-2526. (査読有)
- 9) Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi M., and Narusaka, Y. (2009) *RRS1* and *RPS4* provide a dual resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. **Plant Journal** 59:672-683. (査読有)
- 10) Narusaka, M., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., and Narusaka, Y. (2009) A dual resistance gene system prevents infection by three distinct pathogens. **Signaling & Behavior** 4: 954-955. (査読有)

〔学会発表〕(計 19 件)

- 1) Kaoru Tanaka and Yasuyuki Kubo
Functional analysis of a novel pathogenicity-associated gene *CoPRF1* in the anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*
2012 11th European conference on Fungal Generics, Marburg, Germany
- 2) Kaoru Tanaka and Yasuyuki Kubo
Identification and characterization of a novel pathogenicity-associated gene *CoPRF1* in the anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*
2012 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka, Japan
- 3) Ken Harata and Yasuyuki Kubo
Characterization of *CoIRA1* of *Colletotrichum orbiculare*, an anthracnose disease fungus of cucumber, required for infection-related morphogenesis and pathogenicity
2012 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka, Japan
- 4) Fumi Fukada, Ayumu Sakaguchi, and Yasuyuki Kubo
Colletotrichum orbiculare *CoBUB2*, the homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *BUB2*, is involved in morphogenesis and pathogenesis
2012 2nd Korea-Japan Joint Symposium, Fukuoka, Japan
- 5) Ayumu Sakaguchi, Naoki Fujihara, Gento Tsuji, Ulla Neumann, Richard O'Connell and Yasuyuki Kubo
Colletotrichum orbiculare *Fam1p*, a pex22 like peroxin unique in filamentous ascomycete, is required for appressorium mediated infection and associates with Woronin body
2011 Asian Mycological Congress, Seoul, Korea
- 6) Yasuyuki Kubo
Appressorium function in *Colletotrichum orbiculare* and prospect for genome based analysis 2011
14th Fungal Genetics and Biology Conference of the Microbiological Society of Korea, Chungnam, Korea.
- 7) Ayumu Sakaguchi, Naoki Fujihara, Gento Tsuji, Ulla Neumann, Richard O'Connell and Yasuyuki Kubo
Fam1p, a peroxin unique to filamentous ascomycete fungi, is required for pathogenesis and is transferred to Woronin bodies in *Colletotrichum orbiculare*
2010 9th International Mycological Congress, Edinburg, United Kingdom
- 8) Ayumu Sakaguchi, Naoki Fujihara, Gento Tsuji, Ulla Neumann, Richard O'Connell and Yasuyuki Kubo
Novel peroxin, *Fam1p* of *Colletotrichum orbiculare* is essential for pathogenesis and associates with Woronin bodies
2010 10th European conference on Fungal Generics, Edinburg, United Kingdom
- 9) Shigeyuki Tanaka, Nobuaki Ishihama, Hirofumi Yoshioka, Gento Tsuji, Seiji Tsuge and Yasuyuki Kubo
Fungal cell surface PAMPs trigger plant basal resistance through activation of mitogen-activated protein kinase pathway.
2009 14th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions Quebec, Canada.
- 10) 原田 賢・久保康之
ウリ類炭疽病菌 RAS GTPase activated protein *CoIRA1* は感染器官の分化や病原性に関与する
平成 24 年度 日本植物病理学会大会
- 11) 深田史美・坂口 歩・久保康之
ウリ類炭疽病菌の出芽酵母 *BUB2* ホモログ遺伝子 *CoBUB2* は形態形成および病原性に関与する
平成 24 年度 日本植物病理学会大会
- 12) 望月 進・齋藤憲一郎・久保康之・南 栄一・西澤洋子
イネいもち病菌感染初期過程におけるミトコンドリア凝集反応の観察
平成 24 年度 日本植物病理学会大会
- 13) Gan, P., Narusaka, Y., Takano, Y., Kubo, Y., and Shirasu, K.
Genomic and transcriptomic analysis of the hemibiotrophic plant pathogen *Colletotrichum orbiculare*
平成 24 年度 日本植物病理学会大会
- 14) 鳴坂真理・白須 賢・久保康之・白石友紀・畠山勝徳・平井正良・河本晃一・江面浩・高野義孝・岩渕雅樹・鳴坂義弘

デュアル抵抗性蛋白質システムによる
病原体認識機構の解明：RPS4 と RRS1
遺伝子の作物への導入
平成 23 年度 日本植物生理学会大会

- 15) 中井勇介・中平洋一・住田浩規・安居
佑季子・河内孝之・高木優・光田展隆・
久保康之・佐藤雅彦
NAC-like transcription factors VOZ は生
物学的ストレスと非生物学的ストレス
との切り換え制御に關与する
日本植物学会平成 23 年度大会
- 16) 高野義孝・多賀正節・鳴坂義弘・白須
賢・久保康之
ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum*
orbiculare) 104-T (MAFF240422) のゲ
ノム解析
平成 23 年度 日本植物病理学会大会
- 17) 多賀正節・田中 薫・久保康之
ウリ類炭疽病菌の核型と染色体の細胞
学的解析
平成 23 年度 日本植物病理学会大会
- 18) 鳴坂真理・白須 賢・久保康之・豊田
和弘・白石友紀・岩淵雅樹・鳴坂義弘
デュアル R- 遺伝子システムによる病
原菌認識機構の解明
平成 22 年度 日本植物病理学会大会
- 19) 久保康之
ウリ類炭疽病菌の侵入器官の形態形成
と病原性 2011 年
第 11 回糸状菌分子生物学コンファレ
ンス

[図書] (計 1 件)

- 1) Kubo, Y. (2011) Appressorium Function
in *Colletotrichum orbiculare* and Prospect
for Genome Based Analysis. *In*
**Morphogenesis and Pathogenicity in
Fungi Series: Topics in Current
Genetics**, Vol. 22 Pérez-Martín, José and
Di Pietro, Antonio (Eds.) 1st Edition., 276
p. (査読有)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://ykubo.blog.eonet.jp/>

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

西内 巧 (NISHIUCHI TAKUMI)
金沢大学・学際科学実験センター・
准教授
研究者番号 20334790

古賀 博則 (KOGA HIRONORI)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号 60290079

(3) 連携研究者

吉岡 博文 (YOSHIOKA HIROFUMI)
名古屋大学・生命農学研究科・准教授
研究者番号：30240245