

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 18 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780039

研究課題名（和文） イネいもち病菌エフェクターの宿主細胞内移行機構の解明

研究課題名（英文） A study on translocation of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* effectors into host cytoplasm

研究代表者

吉田 健太郎 (YOSHIDA KENTARO)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学部・研究員

研究者番号：40570750

研究成果の概要（和文）：イネいもち病は、イネの収量減少を招くため、発生を抑えることが重要である。そのため、イネいもち病を引き起こすいもち病菌の感染過程を明らかにする必要がある。いもち病菌は、イネに感染時に、エフェクターというタンパク質を分泌し、イネの細胞内に移行後、イネの防御応答を攪乱し、病気を助長する。本研究では、エフェクターのうち、細胞外へ分泌する時に重要な短い領域だけで、イネの細胞内へ移行できることを示した。

研究成果の概要（英文）：It is important to develop methods to prevent rice blast from causing loss of rice yields. We need to clarify the infection process of rice seedlings by rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *M. oryzae* secretes effector proteins, which are translocated into rice cytoplasm, disrupt defense responses of rice, and enhance the blast disease. In this study, we show that the signal peptide of effectors is enough to be delivered into rice cytoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用、エフェクター

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌の感染、植物免疫において、植物病原菌が分泌するエフェクターが、感染成立・阻止の可否を決定する重要な因子であることがわかってきた。エフェクターには、植物細胞内で作用するものがあり、その植物細胞内移行機構の解明は、植物と病原菌の分子レベルにおける相互作用研究の主要な課題である。しかし、多くの植物病の原因となる糸状菌においては、細胞

内移行に必要なモチーフ、植物側の因子、移行の機構についてほとんど解明されていない。我々が、以前、ゲノム解析と連関解析によって発見した新規イネいもち病菌エフェクター AVR-Pia、AVR-Pii、AVR-Pik/km/kp は、宿主細胞内で働いている間接的な証拠を得ていた。これらのエフェクターの分泌シグナル配列を除いたものをイネプロトプラストで一過的に発現させると、分泌シグナル配列を有するも

のより細胞死が強く誘導された。このことは、エフェクターがイネ細胞内で作用していることを示唆している。これらエフェクターにおいて、細胞内移行に関与するモチーフを発見できれば、未知の宿主細胞内で作用するエフェクターをゲノム解析から今まで以上に確度が高く推定できる。更に、細胞内移行に必要なイネ相互作用因子を同定することができれば、病原菌の感染成立の可否に重大な役割を果たすエフェクターの細胞内移行を妨げるように相互作用因子を改変したいもち病に強いイネの作出につながる。これは、あらゆるいもち病菌に対して有効である。また、いもち病菌だけでなく、他の糸状菌でも同じ機構を用いてエフェクターを宿主細胞内に注入しているならば、糸状菌による様々な病気に対して強いイネ品種作出にも応用できる。

2. 研究の目的

イネいもち病菌エフェクターのイネ細胞内移行機構について解明することを目的とする。この目的を達成するにあたり、エフェクターについて以下の点を明らかにする。

- (1) 植物細胞内に移行したという直接的な証拠を得る。
- (2) 細胞内移行モチーフを明らかにする。
- (3) 細胞内移行に関与するイネの因子を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 植物細胞内に移行したという直接的な証拠を得るために、エフェクターと蛍光タンパク質、更に核移行シグナルを融合させたタンパク質を発現する形質転換いもち病菌を作出し、融合タンパク質の細胞内局在を観察する。
- (2) ①植物細胞内へ移行するのに必要な領域を解明するために、変異型非病原力エフェクター（以下、変異型 AVR とする）を作出する。変異型 AVR を、この AVR を持たないイネいもち病菌株に導入する。その形質転換いもち病菌をイネに接種し、病徴を観察する。更に、変異型 AVR を、非親和性イネプロトプラストで一過的に発現させ、細胞死の有無を確認する。もし、プロトプラストで細胞死がおこるが、いもち病菌形質転換体の接種実験では、病徴の伸展が見られた場合、変異型 AVR は、植物細胞内へ移行することができなかつたと考えられ、変異を導入した領域に植物細胞内移行に必要なモチーフが存在する可能性がある。イネプロトプラストの一過的発現解析では、細胞死をルシフェラーゼ活性によって検出する（図 1）。

- 変異型 AVR の発現はエピトープタグをウェスタンブロット法で検出して確かめる。
- ② 蛍光タンパク質と核移行シグナルに AVR タンパク質を削った変異型 AVR (AVR 欠失変異) を融合させたタンパク質を発現させた形質転換いもち病菌を作出し、融合タンパク質の細胞内局在を観察する。核移行が検出されなければ、削った領域が細胞内移行に必要なであると言える。
 - (3) Yeast 2-hybrid 法を用いて、いもち病菌エフェクターの細胞内移行に関与するイネの因子を明らかにする。

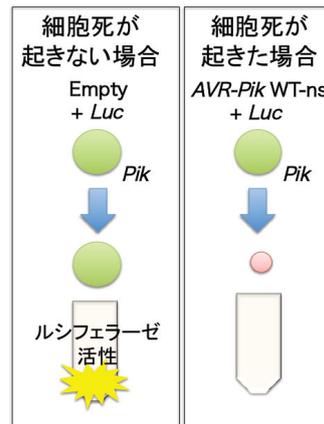


図 1 イネプロトプラストによる AVR 一過的発現による細胞死検出法。細胞死が起きない場合は、ルシフェラーゼの活性が検出できるが、細胞死が起きた場合、活性が検出されない、若しくは活性が減少する。遺伝子をエレクトロポレーション法によって、イネプロトプラスト導入後 40 時間で、ルミノメーターによりルシフェラーゼ活性を測定する。

4. 研究成果

研究の主な成果

以前我々が単離した非病原力エフェクターのうち、非病原力エフェクターに対する非親和性イネの抵抗性が顕著である AVR-Pik に絞って解析を進めた。

- (1) 植物細胞内に移行したという直接的な証拠を得ることができた。AVR-Pik と蛍光タンパク質 mCherry と核移行シグナル (AVR-Pik- mCherry-NLS) を融合したタンパク質を、AVR-Pik プロモーターによって発現させるようなベクターを作出し、イネいもち病菌 Sasa2 菌株に導入した。この形質転換いもち病菌を親和性のイネへ葉鞘接種した。30-36 時間の間に感染葉鞘の細胞を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、イネ細胞の核に蛍光タンパク

質のシグナルが検出された。また、いもち病菌の感染した細胞の隣接細胞においてもシグナルが検出された(図2)。また、AVR-Pik プロモーターの代わりに別のエフェクターAVR-Pia プロモーター、PWL2 プロモーターの下流で AVR-Pik-mCherry-NLS を発現させた場合も、イネの核に蛍光シグナルが検出された。

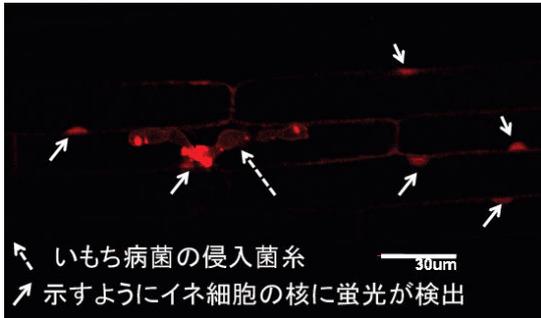


図2 AVR-Pik-mCherry-NLS のイネ細胞内への移行。AVR-Pik-mCherry-NLS させた形質転換いもち病菌を親和性イネ品種「蒙古稻」に接種。接種後 30 時間後の感染細胞

(2) いもち病菌エフェクターの細胞内移行に必要な領域は、エフェクターの分泌シグナルにあることが明らかになった。研究方法 2-(1) を用いて、細胞内移行に必要な領域を絞り込んだ。その結果、AVR-Pik のアミノ酸配列 LSRE (ロイシン、セリン、アルギニン、グルタミン酸) の領域を AAAA (アラニン、アラニン、アラニン、アラニン) にするとプロトプラスト実験では、コントロールに比べて、ルシフェラーゼの活性が低い値を示した。正常な AVR-Pik に比べてルシフェラーゼの活性は高い値を示した(図3)。

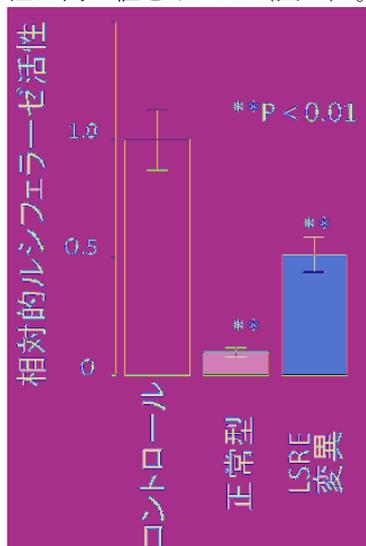


図3 イネプロトプラストによる変異型 AVR-Pik の一過的発現による細胞死検証実験。細胞死の程度は、正常型 > LSRE 変異 AVR-Pik > コントロール(空ベクター)の順に大きい。

この変異型 AVR-Pik を導入した形質転換いもち病菌を非親和性のイネに接種すると、イネは、罹病した(図4)。すなわち、この領域が、エフェクターの細胞内移行に必要な領域の可能性がある。更に、この領域が細胞内移行に必要であるかを検証するために、研究方法 2-(2) を用いて検証した(図5)。

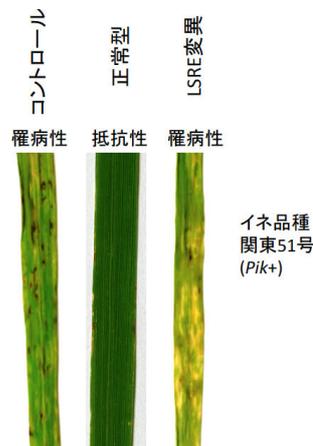
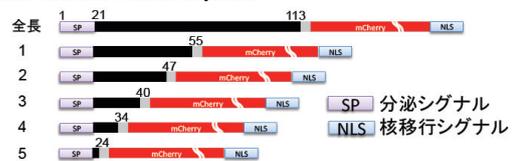


図4 LSRE 変異 AVR-Pik を導入した形質転換いもち病菌の接種実験結果。正常型では、Pik により抵抗性反応が誘導され、いもち病菌は感染しなかった。しかし、空ベクターを導入したいもち病菌と、LSRE 変異 AVR-Pik を導入したいもち病菌は、Pik の抵抗性反応を誘導されず、感染した。

AVR-Pik 欠失変異:mCherry-NLS



AVR-Pik 欠失変異を導入した形質転換いもち病菌の葉鞘接種30時間後の感染細胞

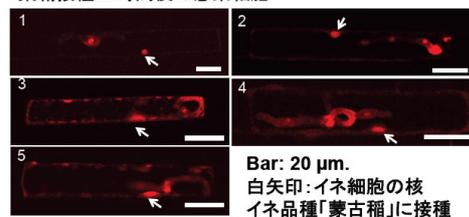
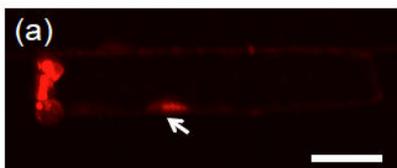


図5 いもち病菌から分泌された欠失変異 AVR-Pik、蛍光タンパク質 mCherry 核移行シグナル、NLS の融合タンパク質の細胞内局在。

下の写真の数字と上の AVR-Pik 欠失変異の数字は対応する。5 は、AVR-Pik の分泌シグナル配列にスペーサー配列と、蛍光タンパク質 mCherry、核移行シグナル NLS をつなげたものである。つまり、AVR-Pik の分泌シグナル配列さえあれば、いもち病菌から分泌された後、宿主細胞内へ移行することを示している。

その結果、AVR-Pik の分泌シグナル配列と mCherry-NLS の融合タンパク質は、いもち病菌から分泌された後、イネの核へ移行することがわかった。また、エフェクターのプロモーターで発現させた場合、エフェクターではないキシラナーゼタンパク質の分泌シグナル配列でもイネ細胞内への移行が観察された。更に、感染時に発現し、細胞内に移行しないことが報告されている分泌タンパク質 Bas4 のプロモーターの下流で発現させた場合でも、エフェクターの分泌シグナル配列があれば、イネ細胞内に移行することがわかった (図 6a)。そして、驚くべきことに、Bas4 の分泌シグナル配列でも移行することが観察された (図 6b)。以上の結果は、細胞外分泌タンパク質は、感染時にタンパク質が発現し、細胞外に分泌されれば、宿主細胞内へ移行するというを示唆している。



**Bas4 プロモーターで発現した
AVR-Pik分泌シグナル-mCherry-NLS**



**Bas4 プロモーターで発現した
Bas4分泌シグナル-mCherry-NLS**

図 6 形質転換いもち病菌を親和性イネ品種「蒙古稻」に葉鞘接種した 30 時間後の感染細胞。白い矢印は、イネ細胞の核。核に融合タンパク質のシグナルが検出されたことから、融合タンパク質が、いもち病菌から分泌された後、イネの核へ移行したことを示している。

そして、イネ細胞内に移行しない Bas4 に代表されるタンパク質は、分泌タンパク質の本体部分が、イネ細胞内への移行を阻害していると推測された。

当初の予測と異なり、エフェクターの本体ではなく、シグナル配列部位だけで細胞内移行することがわかったため、イネの相互作用因子を同定する実験を進めることはできなかった。

得られた結果の国内外の位置づけ、及び今後の展望

現在までに、いもち病菌は、BIC と言われる構造からエフェクターが、宿主細胞内に移行することがわかっている。また、エフェクターのプロモーターと分泌シグナル配列が、宿主細胞内移行に重要であるとしている (et al. 2010 Plant cell)。今回の研究で、プロモーターではなく、分泌シグナル配列が特に重要であることが分かってきた。疫病菌では、宿主細胞内移行に必要なモチーフが明らかにされている。しかし、いもち病菌では分泌シグナル配列さえあれば、宿主細胞内移行が可能であるということは、いもち病菌は、疫病菌とは異なる方法で、エフェクターをイネ細胞内へ移行していることを示唆している。今後は、なぜ分泌シグナル配列だけあれば、宿主細胞内へ移行できるのか？または、それを介添えするいもち病菌、イネの分子が存在するのかといった問題を解決する必要がある。

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 4 件)

- ①Terauchi, R., Yoshida, K. Toward population genomics of effector-effector target interactions. *New Phytologist*, 査読有, 187, 2010, 929-939.
DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03408.x
- ②Matsumura, H., Yoshida, K., Luo, S., Kimura, E., Fujibe, T., Albertyn, Z., Barrero, R.A., Krüger, D.H., Kahl, G., Schroth, G.P., Terauchi, R. High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using Next Generation Sequencing. *PLoS ONE*, 査読有, 5, 2010, e12010.
DOI:10.1371/journal.pone.0012010
- ③Okuyama, Y., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida,

K., Tamiru, M., Saitoh, H., Fujibe, T., Matsumura, H., Shenton, M., Galam, D.C., Undan, J., Ito, A., Sone, T., Terauchi, R. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant Journal*, 査読有, 66, 2011, 467-479.

DOI:10.1111/j.1365-313X.2011.04502.x

- ④ Chuma, I., Isobe, C., Hotta, Y., Ibaragi, K., Futamata, N., Kusaba, M., Yoshida, K., Terauchi, R., Fujita Y., Nakayashiki, H., Valent, B., Tosa, Y. Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathogens*, 査読有, 7, 2011, e1002147.

DOI:10.1371/journal.ppat.1002147

[学会発表] (計2件)

- ① 吉田健太郎 Identification of genes involved in the interactions among organisms through genomic data. 第10回日本分類学会連合、2011年1月、科学技術博物館分館
- ② 吉田健太郎 イネいもち病菌エフェクターの宿主細胞内移行及び細胞死誘導に関する領域の探索. 植物病理学会、2010年4月、京都国際会館

[図書] (計1件)

- ① 吉田健太郎 種生物学会編、責任編集 永野 惇・森長 真一、ゲノムが拓く生態学遺伝子の網羅的解析で迫る植物の生きざま、文一総合出版、2011年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 健太郎 (YOSHIDA KENTARO)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究部・研究員

研究者番号：40570750