

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14904

研究課題名（和文）エフェクターの網羅的解析による植物寄生線虫の感染戦略の解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of effectors to elucidate infection strategies of plant parasitic nematodes

研究代表者

佐藤 一輝（Sato, Kazuki）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90842071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：植物寄生性線虫は世界で最も農業被害の大きい植物病原体の一つである。線虫は病原性因子であるエフェクターを分泌し、植物の免疫応答を抑制することで寄生を成立させていると考えられる。しかし、線虫がどのようなエフェクターを分泌し、植物のどの分子を標的として免疫を抑制しているのかは、ほとんどわかっていない。本研究では線虫のゲノム、およびトランスクリプトーム情報とハイスループットなスクリーニング手法を駆使し、線虫エフェクター候補の網羅的な機能解析を試みた。その結果、RNA結合タンパク質を標的として、植物の免疫を顕著に抑える機能を持つ、新しいエフェクターの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物寄生性線虫は多様な作物に甚大な被害を与えており、その被害額は世界全体で年間14兆円に上ると試算されている。従来、線虫の防除は毒性の強い農薬に大きく依存してきたが、人体や環境への悪影響から世界的にその使用が禁止されてきており、より持続可能な防除法への転換が求められている。本研究では、線虫のエフェクターが標的とする植物側因子の解析から、植物のRNA結合タンパク質が免疫の制御に関与しており、線虫への防御応答において重要な役割を持つことを明らかにした。このことから、将来的に線虫に強い作物を創出し、農薬に依存しすぎない線虫防除法を確立する上で、重要な知見を得ることができたといえる。

研究成果の概要（英文）：Plant parasitic nematodes are among the most devastating plant pathogens worldwide. To parasitize host plants, nematodes secrete effectors, which are virulence factors that suppress the plant immune responses. However, our knowledge on nematode effector is limited. In this study, effector mining based on genomic and transcriptomic information of plant parasitic nematodes and functional analyses of effector candidates using a high-throughput screening strategy were carried out. As a result, novel nematode effector that targets RNA-binding protein and drastically suppresses plant immune responses was identified. This study provides new insight into the molecular level interactions that take place between nematodes and plants.

研究分野：植物病理学、寄生虫学

キーワード：植物寄生性線虫 ネコブセンチュウ 植物免疫 エフェクター 生物間相互作用 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ネコブセンチュウはナス科・アブラナ科・イネ科など様々な植物の根に寄生できることが知られており、植物寄生性線虫の中で最も甚大な農業被害をもたらしている。しかし、ネコブセンチュウがどのようなエフェクターを分泌し、どのように植物の免疫を抑制しているのかについての理解は、ほとんど進んでいなかった。その理由として、ネコブセンチュウの高品質なゲノム情報がないためにエフェクター候補の網羅的な探索が行えないこと、またエフェクター候補の機能解析が十分に行われてこなかったことが挙げられる。そこで、ロングリードシーケンサーを用いて高品質なゲノム情報を整備するとともに、ハイスループットな機能的スクリーニング法を用いて大量のエフェクター候補の機能解析を行うことで、こうした問題点を解消できると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

新たな線虫エフェクターの発見と、分子レベルでのエフェクター作用機構の理解

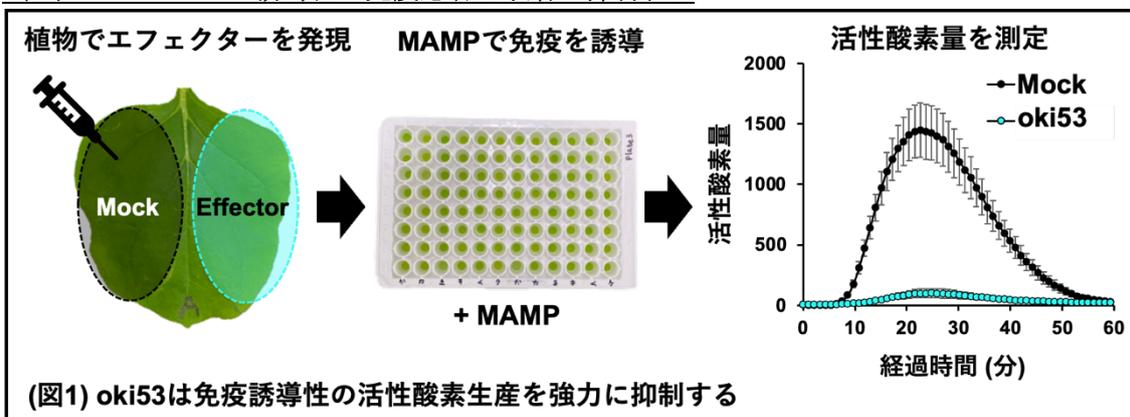
3. 研究の方法

まず国内外で問題になっているアレナリアネコブセンチュウのゲノム・トランスクリプトーム情報を整備し、植物感染直後に発現が誘導され、かつエフェクターとして一般的な特徴を有する遺伝子をバイオインフォマティクスによって絞り込んだ。次に、これらのエフェクター候補遺伝子から約 100 個の遺伝子を植物発現用のベクター、並びに酵母ツーハイブリッドスクリーニング用のベクターにクローニングし、機能的スクリーニングに用いた。機能的スクリーニングとして、微生物関連分子パターン (Microbe-associated molecular patterns; MAMPs) を植物に処理した際の活性酸素生産を抑制するエフェクターのスクリーニング、及び、植物の根に由来する cDNA ライブラリを用いた酵母ツーハイブリッド法によるエフェクターの標的因子のスクリーニングを行った。

4. 研究成果

機能的スクリーニングの結果、植物の免疫を顕著に抑制し、かつ異なる植物宿主において同一の因子を標的とするエフェクターとして、oki53 を同定した。そこで以下では、oki53 の機能解析の結果について詳述する。

(1) oki53 は MAMP 誘導性の免疫応答を顕著に抑制する

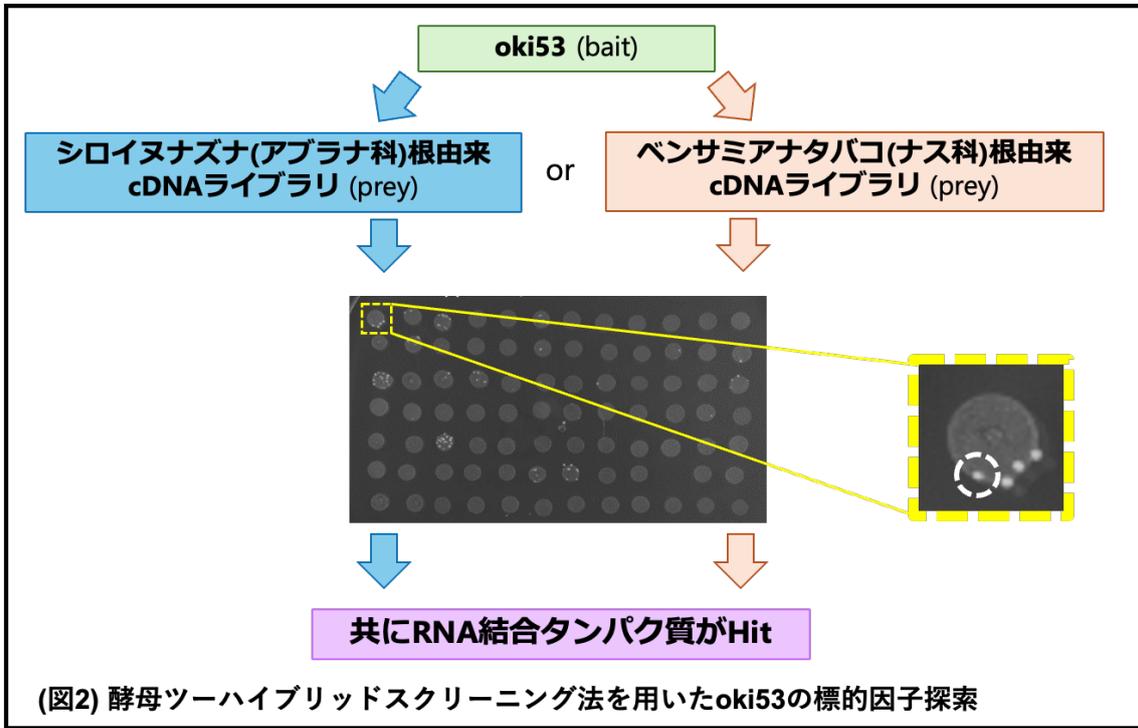


(図1) oki53は免疫誘導性の活性酸素生産を強力に抑制する

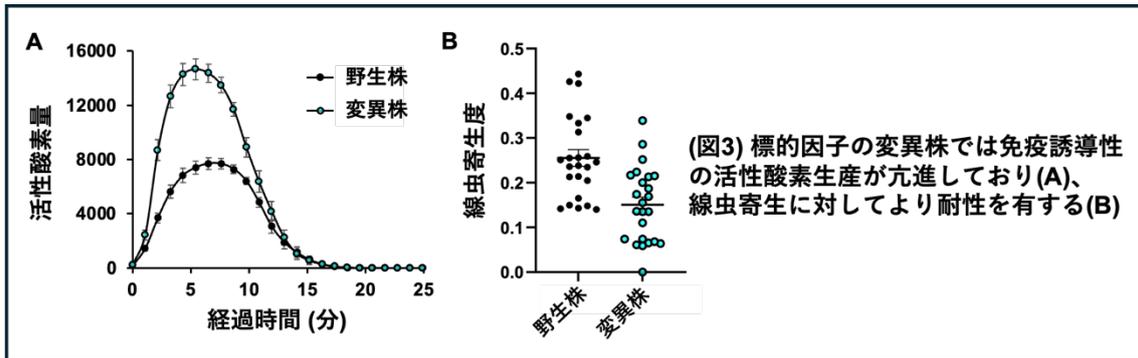
アグロバクテリウムを用いた一過的遺伝子発現によってベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉でエフェクター候補遺伝子を発現させ、エフェクター候補が MAMP 誘導性の活性酸素生産を抑制できるかを調べた。このスクリーニングにより、oki53 を含む複数のエフェクター候補が免疫を抑制することを発見した (図 1)。

(2) oki53 は植物の RNA 結合タンパク質と相互作用する

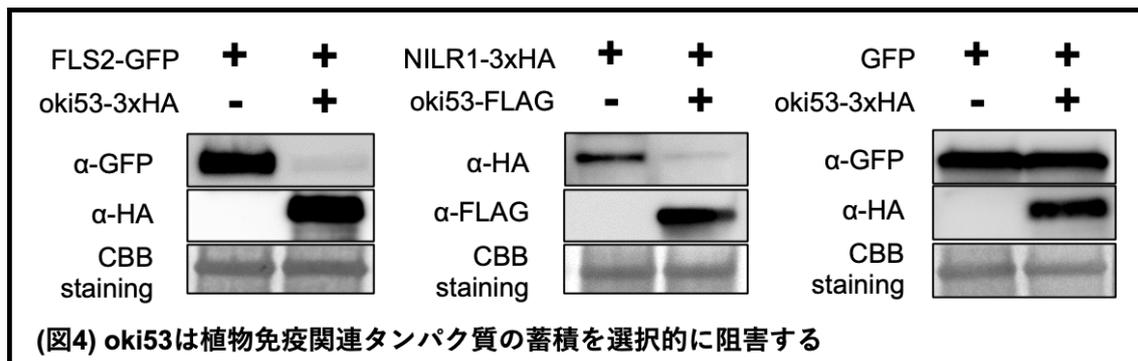
シロイヌナズナ (アブラナ科) の根に由来する cDNA ライブラリを用いて、エフェクター候補が相互作用する植物タンパク質、すなわち標的因子の探索をおこなった。シロイヌナズナで標的因子候補が見つかったエフェクターについては、系統的に離れたナス科植物であるベンサミアナタバコの cDNA ライブラリでもスクリーニングを行うことで、異種植物間で標的因子が保存されているかを検討した。その結果、唯一 oki53 というエフェクター候補だけがシロイヌナズナとベンサミアナタバコの両方で同一の因子、RNA 結合タンパク質の一種を標的としていることがわかった (図 2)。さらに植物体内において oki53 と RNA 結合タンパク質が相互作用することを共免疫沈降法 (Co-Immunoprecipitation) によって確認し、また顕微鏡を用いた観察により、oki53 と RNA 結合タンパク質が植物体内で共局在することも確認した。



(3) RNA 結合タンパク質は免疫を負に制御する
 oki53 が標的とする RNA 結合タンパク質が免疫の制御に関与しているかを明らかにするため、変異株の表現型解析をおこなった。その結果、変異株では MAMP 誘導性の活性酸素生産が亢進しており、さらに線虫寄生に対してより耐性を有していることがわかった (図 3)。このことから、oki53 が標的とする RNA 結合タンパク質は免疫を負に制御する因子であることが示唆された。



(4) oki53 は植物免疫関連タンパク質の蓄積を阻害する
 oki53 が免疫を抑制する分子機構を理解するため、oki53 が免疫反応に関連するタンパク質に与える影響を評価した。ベンサミアナタバコの葉で oki53 と免疫関連タンパク質を共発現させたところ、興味深いことに、oki53 の存在下では免疫関連タンパク質の蓄積が阻害されることがわかった。一方で、植物タンパク質を融合していない GFP のタンパク質量は変化しなかったことから、oki53 によるタンパク質蓄積の阻害は、選択的に行われていることが示唆された (図 4)。



以上の結果から、ネコブセンチュウはエフェクター oki53 によって、植物免疫タンパク質の蓄積を阻害することで、免疫反応を抑制し、寄生を成立させていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Pamela Gan, 植原 健人, 横 紀子, M, Shahid Mukhtar, 白須 賢
2. 発表標題 免疫を負に制御するRNA結合タンパク質を標的としたネコブセンチュウエフェクターの機能解析
3. 学会等名 令和6年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 一輝
2. 発表標題 線虫学者はどう生きるか -寄生虫に学ぶ研究者の多様性-
3. 学会等名 令和5年度 日本植物病理学会関東部会 若手の会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Pamela Gan, 植原 健人, 横 紀子, M, Shahid Mukhtar, 白須 賢
2. 発表標題 RNA結合タンパク質を標的とする線虫エフェクターの機能解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第30回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, ガン パメラ, 植原 健人, 横 紀子, ムフタル M シャヒード, 白須 賢
2. 発表標題 RNA結合タンパク質を標的とするネコブセンチュウエフェクターによる免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和5年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Noriko Maki, M. Shahid Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題 Understanding the molecular basis of plant and root-knot nematode interaction
3. 学会等名 International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Gan Pamela, 植原 健人, 横 紀子, Mukhtar M. Shahid, 白須 賢
2. 発表標題 ネコブセンチュウエフェクターによる植物免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第29回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 一輝
2. 発表標題 植物と線虫の双方から寄生の分子メカニズムに迫る
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Takahiro Bino, Katsushi Yamaguchi, Yasunori Ichihashi, Hideaki Iwahori, Noriko Maki, Shuji Shigenobu, Takamasa Suzuki, Bruno Favery, Shahid M. Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題 Molecular insights into an interaction of resistant plant <i>Solanum torvum</i> and virulent/avirulent root-knot nematodes
3. 学会等名 7th International Congress of Nematology (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 環境資源科学研究センター 植物免疫研究グループ
<http://plantimmunity.riken.jp/>

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