

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658040

研究課題名(和文)植物病原糸状菌の感染戦略に必要な細胞内分解システムの探索と応用展開

研究課題名(英文) Identification of intracellular degradation systems required for infection strategies of phytopathogenic fungus and its application

研究代表者

高野 義孝 (TAKANO, YOSHITAKA)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80293918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：生物は様々な細胞内分解系を有し、このことは「分解」の重要性を示す一方、植物病原糸状菌の感染戦略と細胞内分解系を繋ぐ研究は限られている。本研究は、ウリ類炭疽病菌の感染戦略に関わる細胞内分解系のアウトラインを明らかにすることを目的とする。研究の結果、ATG11遺伝子が本菌の病原性発現およびペルオキシソーム選択的オートファジー分解に関与することを明らかにした。一方で、非選択的オートファジーも本菌の病原性発現に必要であることを発見した。そして、mRNA分解に関わるPボディの動態を含む各種分解系の状態をモニターできる病原菌ラインの利用に基づく、当該分解系を阻害する化合物スクリーニング系を構築した。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic organisms commonly possess various cellular degradation systems, suggesting the importance of 'degradation'. However, there is limited information about roles of cellular degradation system for host infection strategies of phytopathogenic fungi. In this study, we aimed to reveal outlines of cellular degradation systems involved in the pathogens' infection strategies. As a result, we revealed that ATG11 is required for pathogenicity of anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*, and also is involved in selective autophagic degradation of peroxisomes. We also suggested that non-selective autophagic degradation is required for pathogenicity of the pathogen. Furthermore, we have generated a set of transgenic *C. orbiculare* reporter lines to monitor the status of each degradation system, including the dynamics of P bodies involved in mRNA degradation, which will be applied for screening of chemicals that inhibit corresponding degradation systems of the pathogen.

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：植物病原糸状菌 病原性 細胞内分解システム オートファジー ペルオキシソーム RNA Pボディ

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物病原糸状菌と細胞内分解システム

植物病原糸状菌は、農作物の生産において甚大な被害をもたらしており、その制圧は安定した食糧供給実現のための必須課題である。現在、より高い効果持続性を示し、同時に生産環境への負荷を低減させた作物保護技術の開発が課題となっている。この技術開発のためには、敵側の、つまり植物病原糸状菌の戦略を分子レベルで掌握することが非常に重要である。細胞内では様々な生体分子が合成されるが、一般にそれらのほとんどは無秩序に分解されるのではなく、積極的な分解システムによって、適切にその一生に幕引きが行われる。そして、細胞が様々な分解システムを有している事実は、生物におけるこの「分解」というイベントの重要性を如実に示している。にもかかわらず、植物病原性真菌の感染戦略と細胞内分解システムを繋ぐ研究は驚くほど少ない。

(2) ペルオキシソームのオートファジー分解と mRNA 分解

申請者のグループはオートファジー（自食）と呼ばれる細胞内分解系によって、細胞小器官であるペルオキシソームが選択的に分解されることが（この選択的オートファジーはペキソファジーと呼ばれる）、植物病原糸状菌（ウリ類炭疽病菌；学名 *Colletotrichum orbiculare*）の植物感染戦略において、重要な意味を持つことをはじめて報告した（Asakura et al., Plant Cell, 2009, Vol. 21:1291-1304）。さらに、ナンセンス変異依存 mRNA 分解（Nonsense-Mediated mRNA Decay: NMD と略される）と呼ばれる分解機構の因子も、感染戦略において重要であることを先駆的に発見していた（未発表データ）。これらの発見は、植物病原糸状菌の植物感染戦略において、複数の細胞内分解システムが非常に重要な役割を果たしていることを示唆していた。興味深いことに、モデル生物である酵母の研究において、NMD を含む複数の mRNA 分解反応が、P ボディと呼ばれる構造において起きることが発見されていたが、病原糸状菌における P ボディの知見は皆無であった。

2. 研究の目的

(1) オートファジーと植物感染戦略

本研究では、申請者のグループによって植物病原性とのリンクが初めて発見された二つの細胞内分解システム（オートファジー分解システムおよび mRNA 分解システム）に主に焦点をあて、植物病原糸状菌の植物感染戦略における、細胞内分解機構の生理・分子機能の先駆的解明を試みることを目的としている。オートファジーシステムについては、ペキソファジーに主に焦点をあてつつ、他のオートファジーシステムについても研究し、オートファジー全体が病原糸状菌の感染戦略

にどのような役割を果たしているのか、そのアウトラインを明確にする。

(2) mRNA 分解システムと植物感染戦略

一方、mRNA 分解システムについては、P ボディに注目し、糸状菌でほとんど研究されていないこの細胞内構造について知見を得る。これまでに植物病原糸状菌における P ボディの可視化の例はなく、特にこの P ボディの蛍光可視化に焦点をあてる。さらに、モデル生物において、P ボディに局在することが報告されている mRNA 分解関連因子について機能解析をおこない、その感染戦略への関与、および NMD への必要性を調査し、感染戦略に必要な mRNA 分解システムのアウトラインを明らかにする。

さらにこれらの研究を通じて明らかにした、ウリ類炭疽病菌の病原性に必要な細胞内分解システムについて、その状態を病原菌そのもので蛍光イメージングできるシステムを樹立し、当該細胞機能の阻害効果を高効率でモニターできるスクリーニング系のプロトタイプを構築する。

3. 研究の方法

本研究では、植物病原性糸状菌の感染戦略に必要な細胞内分解系（オートファジー分解システム、P ボディ関連 mRNA 分解システム）に焦点をあてるが、その研究方針・方法は以下の通りである。

(1) 病原菌における選択的オートファジー研究

選択的オートファジーの一つであるペキソファジーについては、酵母などの研究により選択的オートファジーに関与すると推定されるオートファジー関連遺伝子 *ATG11* の機能解析をおこなう。さらに酵母においてミトコンドリアに対する選択的オートファジー（マイトファジーと呼ばれる）に関与する *ATG32* 遺伝子に関しても、そのホモログを探索し、同定できれば機能解析をおこなう。

(2) 病原菌における非選択的オートファジー研究

非選択的オートファジーの研究に関しては、オートファジー全体に必要な *ATG1*、および、酵母研究より非選択的オートファジーに特異的に関与すると推定される *ATG17* について、そのオルソログ遺伝子を同定し機能解析をおこなう。

(3) 病原菌における P ボディの可視化

本菌の NMD に必要な UPF1 は、他の生物において P ボディに局在することが報告されている。そこで、UPF1 に蛍光タンパク質を付加したものを病原菌細胞で発現し、その局在を観察する。P ボディ様のシグナルが観察されれば、さらに他の P ボディ関連因子に関しても、同手法で蛍光可視し、その共局在性を調べる

ことにより、検証を重ねる。

(4) P ボディ関連 mRNA 分解因子の機能解析
他のモデル生物の研究より P ボディにおける mRNA 分解に広く関与している遺伝子 *DCP1* (脱キャップ酵素をコードする) について、そのオルソログ遺伝子を同定し、標的遺伝子破壊株を作出する。得られた破壊株について、その病原性等の表現型解析をおこなうとともに、その細胞内局在性および NMD への影響を調査する。

(5) 化合物スクリーニング系

上記の研究を通じて得られた結果をベースに、植物感染に必要とされる病原菌の細胞内分解系をターゲットとするような化合物スクリーニング系の構築を検討する。特に胞子細胞において、それぞれの細胞内分解系の状態をモニターできるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 選択的オートファジーの研究

ウリ類炭疽病菌の *ATG11* オルソログ遺伝子断片を相同性に基づく PCR により増幅し、続いて、その全長を決定した。次に、ウリ類炭疽病菌の *ATG11* 遺伝子の破壊ベクターを構築し、*ATG11* 標的遺伝子破壊株を作出した。その結果、*ATG11* 破壊株は宿主植物への病原性の低下を示し、このことより、*ATG11* が本菌の病原性発現に関与することが明らかとなった。続いて、*ATG11* 破壊株におけるペキソファジー動態を調査した結果、*ATG11* 破壊株では野生型株と比較して、付着器細胞におけるペキソファジーの効率が低下していることが判明した。このことより、本菌のペキソファジーには、すでに報告している *ATG26* 遺伝子に加えて (Plant Cell, 2009, Vol. 21)、*ATG11* 遺伝子が関与していることが明らかとなった。一方、酵母においてマイトファジーに関与する *ATG32* 遺伝子に関しては、近年になり明らかになったウリ類炭疽病菌のゲノム配列をもとに詳細な探索をおこなったが、その明確なホモログを見つけることはできなかった。さらにペルオキシソーム代謝系の研究を推進する過程で、ペルオキシシンである PEX14 に相同性を有する遺伝子が、本菌のペキソファジーに関与することを発見した。PEX14 は、酵母などではペルオキシソームに局在することが報告されており、この PEX14 を目印に、ペキソファジーが実行されている可能性があり、今後、さらに研究をおこなっていく必要がある。また、同様にペルオキシソーム代謝系の研究過程で、付着器細胞の成熟化において、その細胞内脂肪滴が急速に分解され、さらにこの分解にはペルオキシソーム内の脂肪酸 β 酸化機能が重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、同時にこの脂肪酸 β 酸化機能が、本菌の宿主感染に必須であることを明らかにした。近年の動物細胞の研究により、脂肪顆粒に選択的なオー

トファジー機構 (リポファジー) が発見されており、本菌での脂肪顆粒が、このリポファジーによるものなのか、今後、研究をおこなっていききたい。もし、リポファジーの関与が示されれば、本菌の感染プロセスにおいて複数の選択的オートファジーが非常に精密に制御されていることになる。

(2) *ATG1* の機能解析

非選択的オートファジーの役割を調べるために、まず、オートファジー全体に関与すると推定される *ATG1* オルソログ遺伝子の機能解析をおこなった。ウリ類炭疽病菌の *ATG1* 遺伝子断片を増幅し、その全長を決定した。続いて、ウリ類炭疽病菌の *ATG1* 遺伝子の破壊ベクターを構築し、*ATG1* 破壊株を作出した。*ATG1* 破壊株は病原性を完全に失っており、さらに栄養培地上のコロニーは、胞子形成の顕著な低下を示した。これらの表現型は、すでに報告している *ATG8* 遺伝子の破壊株の表現型に酷似していた (Plant Cell, 2009, Vol. 21)。さらに、細胞質中に発現させた赤色蛍光タンパク質 (RFP) に対する非選択的オートファジー分解について、*ATG1* 破壊株の状態を調査した結果、*ATG8* 破壊株と同様に、その分解に関し顕著な欠損をしめた。このことより、オートファジー全体の機能不全は、ペキソファジーの不全よりも、よりシビアな欠損を生じることが明確となった。このことは、非選択的オートファジーが選択的オートファジーに加え、重要な役割を担っていることを強く示唆した。

(3) 選択的オートファジーと非選択的オートファジーの関連

そこで、非選択的オートファジーに優先的に関与する *ATG17* 遺伝子の機能解析を実施した。ウリ類炭疽病菌の *ATG17* オルソログ遺伝子を同定し、その破壊株を作出した。*ATG17* 遺伝子破壊株は、宿主植物であるキュウリに対する病原性の低下を示した。このことより、非選択的オートファジーが本菌の植物感染機構に関与することが推定された。さらに *ATG17* 破壊株の感染行動を調査した結果、破壊株は野生株と同様のメラニン化した付着器を形成する一方、その付着器からの侵入菌糸の形成に関しては、野生株に比べて明確な低下を示した。このことより、*ATG17* 依存的な非選択的オートファジーが、本菌の付着器細胞における機能発現において重要な役割を担っていることが判明した。興味深いことに、*ATG26* 破壊株についても、類似した表現型が観察されており (Plant Cell, 2009, Vol. 21)、ペキソファジーと非選択的オートファジーの両システムが、この侵入器細胞において重要な役割を共に担っていると推定された。一方、*ATG1* 破壊株や *ATG8* 破壊株では、胞子発芽や付着器形成そのものの段階において、部分的な欠損が観察されている。このことは、非選択的オートファジーと選択的オ

オートファジーが、これらの初期形態分化ステップにおいては、補完的な役割を担っている可能性を示しており、非常に興味深い。その分子的背景の理解のためには、さらなる研究が必要であろう。

(4) 病原菌細胞における P ボディの蛍光可視化

これまでに病原糸状菌細胞において、P ボディの可視化の報告はなかった。今回、すでに本菌の NMD への関与を明確にしている因子 UPF1 について、その局在を GFP (緑色蛍光タンパク質) と UPF1 の融合遺伝子を作成して調べた。まず、UPF1-GFP 融合遺伝子をウリ類炭疽病菌の UPF1 破壊株に導入した結果、破壊株の病原性低下などの表現型の回復が観察された。このことより、UPF1-GFP 融合タンパク質は UPF1 としての機能を保持していることが強く示唆された。この UPF1-GFP 発現株について、その GFP の蛍光シグナルを観察した結果、その細胞内に明確なドットシグナルが検出され、このシグナルが P ボディに対応する可能性が示唆された。さらに、UPF1-RFP (赤色蛍光タンパク質) 遺伝子についても同様に構築し、本菌において発現させた結果、UPF1-GFP 融合タンパク質を発現させた場合と同じく、UPF1-RFP の明確なドットシグナルが観察された。これらのドットシグナルが P ボディであることを証明するために、複数のモデル生物において P ボディに共通して存在する DHH1 に焦点をあてた。ウリ類炭疽病菌の DHH1 オルソログ遺伝子断片を相同性に基づく PCR により増幅し、続いて、その全長を決定した。そして、DHH1-GFP 融合遺伝子を構築し、ウリ類炭疽病菌において発現させた。その結果、UPF1-GFP 発現時と同様に、明確なドットシグナルが観察された。さらに、この DHH1-GFP 融合遺伝子を UPF1-RFP 発現株に導入することにより、DHH1-GFP と UPF1-RFP を同時に発現させた結果、GFP シグナルと RFP シグナルのパターンは一致した。これらの結果より、検出されたドットシグナルは P ボディに対応しており、本菌における P ボディの可視化に成功したと結論づけた。

(5) ウリ類炭疽病菌の DCP1 遺伝子の機能解析
ウリ類炭疽病菌の DCP1 オルソログ遺伝子断片を相同性に基づく PCR により増幅し、続いて、その全長を決定した。つづいて、DHH1 と同様の手法で、その局在解析を実施した。その結果、DCP1-GFP は、ウリ類炭疽病菌細胞において、ドット状のシグナルを示し、さらに、そのシグナルは UPF1-RFP と共局在した。これらの結果より、DCP1 も UPF1 や DHH1 と同様に、本菌の細胞内の P ボディに局在することが明らかとなった。続いて、DCP1 遺伝子破壊株を作成した。その結果、破壊株は栄養生育に顕著な低下を示し、さらにその病原性の欠損を示した。このことより、P ボディに局在する DCP1 が、本菌の植物感染ステージを

含む様々なステージにおいて、重要な役割を果たしていることが判明した。この DCP1 の NMD への関与を調査するために、本菌の NMD レポーター株において、DCP1 遺伝子の破壊をおこなった。得られた株を解析した結果、興味深いことに、DCP1 破壊株においてレポーター遺伝子に対する NMD の欠損は観察されなかった。このことは、一般に mRNA 分解に広く関与する分子として知られている DCP1 が、本菌の NMD には必須ではないことを示している。さらに、この結果は本菌において NMD 以外の P ボディ関連 mRNA 分解機構が宿主感染において重要な役割を担っていることを強く示唆している。今後、mRNA 分解機構の研究を更に進め、それぞれの役割・機能について、さらに研究をおこなうことが重要と思われる。

(6) レポーター病原菌細胞を利用した化合物スクリーニング系

本研究の実施により、ウリ類炭疽病菌の宿主感染に必要な複数の細胞内分解系を明らかにできた。これらの細胞内分解システムを阻害する化合物は、本菌の宿主感染を結果的に阻害すると予想され、新規の病害防除化合物のリード化合物としての特性をもつ可能性が期待できる。本研究では、それぞれの細胞内分解系の状態を病原菌の生細胞において蛍光可視化することで、その化合物スクリーニングが行える系の構築を試みた。胞子細胞を用いることで、簡便なスクリーニングがおこなえることを見出し、この胞子細胞を用いた蛍光顕微鏡によるモニター系を検討した。まず、ペキソファジーについて、以前に作成したペルオキシソーム可視化ラインが有効であることが判明した。オートファジー分解全体 (非選択的オートファジーを含む) に関しては、RFP の強発現株が利用可能であることが判明した。また、脂肪顆粒分解に関しては、BODIPY493/503 による染色が有効であることが見出された。一方、NMD については、GFP を用いたレポーター株の胞子細胞で、NMD が活性化していることを明らかにでき、このレポーター株の利用が非常に有効であることが判明した。NMD 以外の mRNA 分解機構のモニターに関しては、P ボディのモニターが有効であると考えたが、菌糸細胞と比較して、胞子細胞ではラベルされた P ボディの数は非常に少なく、そのモニターは当初は難しいと推定された。しかし、興味深いことに、この P ボディラベル株について、DCP1 遺伝子を破壊した結果、観察される P ボディの数は増大した。この結果より、P ボディ関連 mRNA 分解機構の阻害剤スクリーニングは、P ボディラベル株の胞子細胞における P ボディ数の増大という観点で実施可能であると推察した。

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 4 件）

- ①. Masahide Oku, Yoshitaka Takano, Yasuyoshi Sakai, The emerging role of autophagy in peroxisome dynamics and lipid metabolism of phyllosphere microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 査読有, Vol.5, 2014, Article 81. DOI: 10.3389/fpls.2014.00081
- ②. Yasuyuki Kubo, and Yoshitaka Takano, Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, Vol. 79, 2013, pp. 233-242. DOI: 10.1007/s10327-013-0451-9
- ③. Makoto Asakura, Kae Yoshino, Allison Hill, Yasuyuki Kubo, Yasuyoshi Sakai, and Yoshitaka Takano, Primary and secondary metabolism regulates lipolysis in appressoria of *Colletotrichum orbiculare*, *Fungal Genetics and Biology*, 査読有, Vol. 49, 2012, pp. 967-975, DOI: 10.1016/j.fgb.2012.08.009.
- ④. Lin, Shao Yu, Shiho Okuda, S, Kyoko Ikeda, Tetsuro Okuno, and Yoshitaka Takano, *LAC2* encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*, *Molecular and Plant-Microbe Interactions*, 査読有, Vol. 25, 2012, pp. 1552-1561, DOI: 10.1094/MPMI-05-12-0131-R.

〔学会発表〕（計 6 件）

- ①. Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ken Shirasu, and Yoshitaka Takano, The relation of dicer-dependent RNA interference with infection-related development in a plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*, 12 th European Conference on Fungal Genetics, 平成 26 年 3 月 23, Seville, Spain.
- ②. 高野義孝、植物と病原菌の戦い、日本微生物学連盟フォーラム 「驚きの微生物たち」、平成 25 年 1 月 26 日、東京大学駒場キャンパス
- ③. 劉毅、高橋史香、奥野哲郎、高野義孝、転写後制御系遺伝子 *AGO1* と *CSX1* は、ウリ類炭疽病菌の病原性関連遺伝子である、日本植物病理学会大会、平成 24 年 3 月 28 日、福岡国際会議場
- ④. 林 紹仔、奥田枝穂、奥野哲郎、高野義孝、ウリ類炭疽病菌の病原性に必須である分泌タンパク質遺伝子 *LAC2* の同定及

び機能解析、糸状菌分子生物学カンファレンス、平成 23 年 11 月 17 日、東京大学弥生講堂・一条ホール/アネックス

- ⑤. 林 紹仔、奥田枝穂、奥野哲郎、高野義孝、ウリ類炭疽病菌の病原性に必須である分泌タンパク質遺伝子 *LAC2* の同定及び機能解析、日本植物病理学会関西部会、平成 23 年 10 月 1 日、サンポートホール高松
- ⑥. 高野義孝、植物病原糸状菌の侵入戦略とオートファジー、糸状菌遺伝子研究会、平成 23 年 6 月 3 日、北トピア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 義孝 (TAKANO YOSHITAKA)

京都大学大学院・農学研究科・准教授

研究者番号：80293918

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：