

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05022

研究課題名(和文)植物病原菌エフェクターの第三の機能

研究課題名(英文)The third role of effector proteins secreted by fungal phytopathogen

研究代表者

飯田 祐一郎(Iida, Yuichiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・主任研究員

研究者番号：00456609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原菌は宿主である植物体内に侵入した後、細胞間隙に低分子タンパク質であるエフェクターを分泌する。エフェクターは植物の抵抗性に干渉する病原力因子として機能するが、一方で品種特異的な抵抗性も誘導する。病原菌のエフェクター遺伝子が突然変異や欠失すると抵抗性品種が打破され、新たな系統(レース)に分化することから、栽培現場では大きな問題となっている。環境中においては、植物病原菌も他の一般微生物との間で熾烈な競争を行う必要があることから、我々はエフェクターの微生物間における役割に着目した。そこで本研究では、トマト葉かび病菌エフェクターの菌寄生菌 *Dicyma pulvinata* に対する機能を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トマト葉かび病菌はレース分化によって国内で市販されている抵抗性品種をすべて打破してしまった。また化学農薬に対する耐性菌の発生も報告されており、本病に対する新たな防除戦略の構築が求められている。本研究で用いる菌寄生菌 *D. pulvinata* はトマト葉かび病菌に高い寄生性を示すことから生物防除剤としての可能性を秘めている。さらにエフェクターに対する *D. pulvinata* の機能解析により、国内で問題となっている多様化したレースに対する効果が明らかとなり、将来的には持続的な病害防除に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Leaf mold caused by *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) is the most common disease in tomato (*Solanum lycopersicum*) grown under high humidity such as in a greenhouse. The fungus secretes avirulence effector proteins including Avr2, which encodes a cysteine protease inhibitor, during infection of tomato to inhibit host immunity or to protect itself. Each of those effectors is recognized by the product of a corresponding dominant resistance gene via the gene-for-gene interaction. Cf resistance genes have been introduced into commercial tomato cultivars in Japan, but *C. fulvum* can overcome Cf-mediated resistance by modifying its effector gene, leading to the development of new races. In this study, we determined 植物病理学 Finally, we found a 30-kDa protein secreted from *D. pulvinata* by pull-down assay.

研究分野：植物病理学

キーワード：エフェクター トマト葉かび病 菌寄生菌 レース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌は宿主である植物体内に侵入した後、細胞間隙に低分子タンパク質を分泌することが知られている。これらタンパク質は、植物の基礎的な防御応答等に干渉することで感染拡大を進めることから「エフェクター」と呼ばれる。一方、植物が抵抗性遺伝子を持つ品種の場合は、抵抗性に関わる受容体が病原菌のエフェクターを直接または間接的に認識することで病原菌の侵入を感知し、一連の抵抗性反応が誘導される。しかしながら病原菌は抵抗性品種に対抗して、エフェクター遺伝子を突然変異や欠失させ、新たな系統(レース)に分化することで植物の受容体による認識を回避し、再び感染できるようになる。このような病原菌エフェクターと植物の抵抗性の共進化は軍拡競争 (arms race) に喩えられている。

トマト葉かび病は世界中のトマト栽培において障害となっており、空中浮遊性の糸状菌 *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) によって引き起こされる。化学農薬が多用されていたかつての栽培現場では潜在的に抑制されていた病害であったが、2000年代に入ってから化学農薬に対する耐性菌の発達や、市販の抵抗性品種を打破するレースが多数報告されるなど問題が顕在化した。現在では13種類にも分化したレースが発見されており、このように多様化したトマト葉かび病レースが報告されているのは我が国だけである。我々は本病が多発する栽培施設内において、病斑に寄生する糸状菌を偶然発見した。形態的特徴や分子系統学的解析から、分離菌はトマト葉かび病菌に寄生することが報告されている菌寄生菌 *Dicyma pulvinata* と同定された (Iida et al. 2018 Plant Pathol)。

植物病原菌の多くは感染できる宿主がない環境では、土壌中で枯木や枯草などの有機物をエサに腐生的な生活を営んでいる。言うまでもなく、土壌中には糸状菌細胞壁の分解酵素を分泌する拮抗微生物も多数存在しており、病原菌はこれら分解酵素を細胞外で抑制するなど微生物間での攻防を繰り返していると考えられる。我々は、植物の分解酵素を抑制する病原菌エフェクターが、拮抗微生物が分泌する分解酵素も阻害するのではと考えた。そこで、トマト葉かび病菌とその拮抗微生物である菌寄生菌 *D. pulvinata* を用いて本研究を立案した。

2. 研究の目的

植物病原菌と同様に、ヒトや動物の病原菌においても病原力因子としてエフェクタータンパク質を分泌することから、エフェクターは宿主との相互作用においてのみ重要と考えられてきた。本研究では病原菌エフェクターにおける病原力因子および抵抗性誘導因子としての機能以外に拮抗微生物に対する第三の機能の解明を目指す。エフェクター研究が進展し、またレース分化が農業上の大きな問題となっているトマト葉かび病菌と、拮抗微生物としてトマト葉かび病菌に寄生する *D. pulvinata* を研究対象とする。トマト葉かび病菌のエフェクター *Avr2* は、抵抗性遺伝子 *Cf-2* を持つトマト品種に対する抵抗性誘導因子であり、トマトの細胞間隙に分泌されるシステインプロテアーゼ *Rcr3* と直接結合し、*Cf-2* を介した抵抗性を誘導する (Rooney et al. 2005 Science)。*Rcr3* や同じトマトのシステインプロテアーゼである *Pip1* と結合することから、*Avr2* はシステインプロテアーゼインヒビターとして機能することが明らかとなっており、本研究ではトマト葉かび病菌の *Avr2* に焦点を当て、相互作用する *D. pulvinata* の分泌タンパク質を探索する。

3. 研究の方法

(1) 菌寄生菌 *D. pulvinata* のゲノム情報の解析

はじめにタンパク質の同定に必須となる菌寄生菌 *D. pulvinata* のゲノム情報を取得する。抽出した *D. pulvinata* のゲノム DNA を次世代シーケンサー PacBio RSII および Illumina HiSeq 2000 によって解析し、de novo アセンブル、ORF 予測、遺伝子機能や分泌タンパク質予測などのアノテーション付与によってドラフトゲノム情報を整備する。また植物病原菌、昆虫寄生菌、菌寄生菌、一般微生物などの糸状菌ゲノムと *D. pulvinata* ゲノムを比較解析する。

(2) トマト葉かび病菌エフェクターと相互作用する *D. pulvinata* タンパク質の探索

遺伝子機能をマッピングしたドラフトゲノム情報からシステインプロテアーゼと推定される遺伝子を抽出する。大腸菌による異種発現系を用いて His タグまたは FLAG タグを付与した *Avr2* タンパク質および *D. pulvinata* のターゲットタンパク質を回収、精製する。プルダウンや共免疫沈降法、システインプロテアーゼの特異的検出試薬 DCG-04 を用いて、*Avr2* とターゲットタンパク質の相互作用を *in vitro* で検出する。また *D. pulvinata* の培養濾液から *Avr2* タンパク質をベイトとしたプルダウンアッセイによっても *D. pulvinata* のターゲットタンパク質の同定を目指す。

4. 研究成果

(1) 菌寄生菌 *D. pulvinata* のゲノム解読

D. pulvinata は、群馬県で分離された2菌株、オランダ CBS-KNAW culture collection から2菌株、韓国 Korean Agricultural Culture Collection から2菌株を収集し、トマト葉かび病菌に対する寄生性、トマト上における防除効果および培地上の孢子形成を比較し、414-3株を代表株として用いた (Iida et al. 2018 Plant Pathol)。それぞれの次世代シーケンサーの結果は、ペアエンドシーケンスを行った Illumina HiSeq 2000 から 45,841,052 リード (4,630 Mb) が得られ、ロングシーケンスの PacBio RSII からは 238,713 リード (3,516 Mb) の塩基配列情報を取得した。それ

ぞれ SOAP denovo ver.2.04 および Canu ver.1.5 を用いてアセンブルし、HaploMerger2 により配列を結合したところ 71 個の scaffold (N_{50} = 約 2,9Mb) が得られて、その結果、*D. pulvinata* のドラフトゲノム配列は 46,845,581 bp (coverage depth 98.8x) と推定され、GC 含量は 57.6% であった。また *Fusarium graminearum* ゲノムの遺伝子をモデルとして AUGUSTUS ver.2.7 により推定読み枠を解析した結果、10,700 遺伝子が検出された。全遺伝子について NCBI nonredundant、KEGG、COG、CAZy などのデータベースに対する BLAST 検索によって全体の 83.2% にあたる 8,911 遺伝子にアノテーションを付与した。また SignalP ver.4.0 の解析により全体の 11.9% にあたる 1,278 遺伝子に推定分泌シグナルが検出された。

さらに残り 5 菌株についても、414-3 株をリファレンスにしたリシークエンス (Illumina HiSeq 4000) を実施した。5 菌株の平均取得データは 2,800 Mb (coverage depth 59.7x) であったが、414-3 株と同じ圃場で分離された 414-2 株以外は、414-3 株ゲノムに対するカバー率は低かった。CBS の 2 菌株は *D. pulvinata* と同定されているものの ITS 領域を基にした分子系統学的解析から他の 4 菌株と異なることが明らかとなっており (Iida et al. 2018 Plant Pathol)、ゲノム構造も大きく異なることが示唆された。

(2) 寄生性糸状菌の比較ゲノミクス

次に *D. pulvinata* ゲノムの特徴を明らかにするために、菌寄生菌 (*Trichoderma* 属菌 9 種)、植物病原菌 (*Fusarium* 属菌 3 種、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae*、*Eutypa lata*、*Pestalotiopsis fici*)、昆虫病原菌 *Beauveria bassiana*、エンドファイト *Epichloe festucae*、麹菌 *Aspergillus oryzae*、アカパンカビ *Neurospora crassa* の 19 種の糸状菌ゲノムと比較解析した。麹菌 (Etiomycetes) 以外は Sordariomycetes に属する糸状菌を選定した。CAZy データベースを基にした解析の結果、ゲノムサイズに関わらず、植物病原菌の 6 糸状菌と麹菌 *A. oryzae* の糖質関連酵素をコードする遺伝子数は 800~1400 遺伝子と多数検出されたが、菌寄生性を示す *D. pulvinata* と *Trichoderma* 属菌 9 種、また昆虫病原菌 *B. bassiana*、エンドファイト *E. festucae*、アカパンカビ *N. crassa* では 700 遺伝子以下と少なかった。さらに遺伝子機能の推定から、植物病原菌の 6 糸状菌と麹菌 *A. oryzae* は植物や糸状菌の細胞壁分解、糖タンパク質の生合成などに関わる糖質加水分解酵素 GH ファミリーが他の糸状菌と比べて圧倒的に多く、その他にも多糖リアーゼ (PL ファミリー)、炭水化物エステラーゼ (CE ファミリー) も多い傾向を示した。以上の結果から、糸状菌の寄生宿主によって糖質関連酵素の遺伝子数が異なること、また菌寄生性や昆虫寄生性と比べて植物寄生性は複数の糖質関連酵素が必要な複雑な分解系が関わることを示唆された。

(3) Avr2 エフェクターと相互作用する *D. pulvinata* タンパク質の探索

D. pulvinata ゲノム中からは 9 つのシステインプロテアーゼ遺伝子が同定され、そのうち DpCP4 および DpCP8 が N 末端にシグナルペプチドをコードする分泌タンパク質であることが明らかとなった。*D. pulvinata* は貧栄養条件下でトマト葉かび病菌に寄生し、富栄養条件では寄生しないことから (Iida et al. 2018 Plant Pathol)、*D. pulvinata* の 9 つのシステインプロテアーゼ遺伝子についてトマト葉かび病菌への寄生時 (貧栄養条件) および *D. pulvinata* 単独培養 (富栄養および貧栄養条件) における遺伝子発現をリアルタイム PCR により定量解析した。その結果、DpCP2、DpCP3、DpCP4、DpCP7 および DpCP8 遺伝子が単独培養時と比べて寄生時に発現が誘導されていることが明らかとなった。そこで Avr2 および分泌型タンパク質の DpCP4、DpCP8 について大腸菌による異種発現系を用いて組換えタンパク質を精製・回収し、プルダウンアッセイによって解析したが、明瞭な相互作用は確認されなかった。次に、葉かび病菌の Avr2 遺伝子は他のエフェクターと異なり栄養成長時においても低レベルながら発現が確認されていたことから (Mesarich et al. 2014 MPMI)、同様に *D. pulvinata* の栄養成長時における相互作用タンパク質の探索を行った。*D. pulvinata* の富栄養条件における培養上清を濃縮し、システインプロテアーゼの特異的検出試薬 DCG-04 によって目的タンパク質を検出した。その結果、Avr2 タンパク質の前添加によって約 30kDa のタンパク質のシグナルが減少した。さらに Avr2 タンパク質をベイトとしたプルダウンアッセイによっても同様に約 30kDa のタンパク質が検出されたことから、異なる 2 つの手法を用いて Avr2 と相互作用するタンパク質を発見した。今後、質量分析によって本タンパク質を同定し、*D. pulvinata* の菌寄生性における機能を解明する。

< 引用文献 >

- Iida Y et al. (2018) Evaluation of the potential biocontrol activity of *Dicyma pulvinata* against *Cladosporium fulvum*, the causal agent of tomato leaf mold. Plant Pathology, 67, 1883-1890
- Rooney H.C. et al. (2005) *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. Science, 308, 1783-1786.
- Mesarich et al. (2014) Transcriptome sequencing uncovers the Avr5 avirulence gene of the tomato leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 27, 846-857.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 IIDA Yuichiro	4. 巻 56
2. 論文標題 分解酵素とインヒビターを介した植物と病原菌の攻防	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 244 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.56.244	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kandai Yoshida, Shunsuke Asano, Hirotohi Sushida, Yuichiro Iida	4. 巻 未定
2. 論文標題 Occurrence of tomato leaf mold caused by novel race 2.4.9 in Japa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 窪田昌春, 飯田祐一郎	4. 巻 61
2. 論文標題 国内産品種を基にしたトマト葉かび病菌レース判別系統の作出	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 関西病虫害研究会報	6. 最初と最後の頁 55-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4165/kapps.61.55	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 -
1. 著者名 Sushida Hirotohi, Sumita Takuya, Higashi Yumiko, Iida Yuichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Dicyma pulvinata Strain 414-3, a Mycoparasite of Cladosporium fulvum, Causal Agent of Tomato Leaf Mold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 *
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00655-19	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 -

1. 著者名 Iida Y., Ikeda K., Sakai H., Nakagawa H., Nishi O., Higashi Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Evaluation of the potential biocontrol activity of <i>Dicyma pulvinata</i> against <i>Cladosporium fulvum</i> , the causal agent of tomato leaf mould	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1883 ~ 1890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppa.12916	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yuichiro Iida
2. 発表標題 Race differentiation of tomato fungal pathogen <i>Cladosporium fulvum</i> in Japan
3. 学会等名 NARO International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田祐一郎, 池田健太郎, 酒井宏, 窪田昌春
2. 発表標題 トマト葉かび病の発病を抑制する菌寄生菌 <i>Dicyma pulvinata</i>
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田祐一郎, 西大海, 東佑実子, 中川博之, 中保一浩
2. 発表標題 トマト葉かび病に寄生する <i>Dicyma pulvinata</i> が分泌するセスキテルペン化合物
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirotooshi Sushida, Yumiko Higashi, Yuichiro Iida
2. 発表標題 Cladosporium fulvum Avr2 effector inhibits cysteine proteases secreted from its mycoparasite Dicyma pulvinata
3. 学会等名 XVIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須志田浩稔、住田卓也、東佑実子、中保 一浩、飯田 祐一郎
2. 発表標題 トマト葉かび病菌のエフェクターAvr2と菌寄生菌Dicyma pulvinataのシステインプロテアーゼの相互作用解析
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯田祐一郎
2. 発表標題 食べたいカビと食べられたくないカビの戦い
3. 学会等名 東海植物病理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住田卓也、須志田浩稔、東佑実子、中川博之、中保一浩、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌Dicyma pulvinataが分泌するセスキテルペン化合物deoxyphomenoneの抗菌活性と生合成系
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住田卓也、西大海、須志田浩稔、東佑実子、中川博之、中保一浩、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌 <i>Dicyma pulvinata</i> が分泌するセスキテルペン化合物deoxyphomenoneの生合成遺伝子クラスターの構造と機能
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田昌春、飯田祐一郎
2. 発表標題 国内産品種を基にしたトマト葉かび病菌レース判別系統の作出
3. 学会等名 関西病虫害研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西大海、須志田浩稔、東佑実子、中川博之、池田健太郎、酒井宏、中保一浩、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌 <i>Dicyma pulvinata</i> と麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> に保存されるセスキテルペンdeoxyphomenoneの生合成遺伝子クラスター
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須志田浩稔、西大海、東佑実子、鈴木智子、中保一浩、飯田祐一郎
2. 発表標題 トマト葉かび病菌のエフェクターAvr2は菌寄生菌 <i>Dicyma pulvinata</i> のシステインプロテアーゼの活性を抑制する
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田昌春、飯田祐一郎
2. 発表標題 国内産品種を基にしたトマト葉かび病菌レース判別系統の作出
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西大海、須志田浩稔、東佑実子、中川博之、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌 <i>Dicyma pulvinata</i> と麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> が分泌するsporogen-A01の生合成遺伝子クラスターの構造と機能
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田祐一郎、須志田浩稔、西大海、東佑実子、中保一浩
2. 発表標題 病原糸状菌と宿主植物の分解酵素を介した相互作用
3. 学会等名 植物感染生理談話会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 飯田祐一郎、須志田浩稔	4. 発行年 2019年
2. 出版社 植物防疫（日本植物防疫協会）	5. 総ページ数 5
3. 書名 トマト葉かび病の発生生態と防除	

1. 著者名 飯田祐一郎, 須志田浩稔, 西大海, 東佑実子, 中保一浩	4. 発行年 2018年
2. 出版社 植物感染生理談話会論文集 (日本植物病理学会)	5. 総ページ数 8
3. 書名 病原糸状菌と宿主植物の分解酵素を介した相互作用	

1. 著者名 飯田祐一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学と生物 (日本農芸化学会)	5. 総ページ数 2
3. 書名 分解酵素とインヒビターを介した植物と病原菌の攻防 - 植物病原菌の矛と盾 -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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