

## 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 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20380027

研究課題名（和文）炭疽病菌への非宿主抵抗性に必要な植物因子の研究

研究課題名（英文）Studies on plant factors required for nonhost resistance against anthracnose fungi

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

研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナ *lic1* 変異体は、不適応型菌によって壊死斑を形成し、その原因遺伝子は MACPF ドメインを有する機能未知タンパク質をコードする。本研究では、本変異体の壊死斑形成は菌の侵入を伴っておらず、*lic1* 変異体が非宿主抵抗反応において不適切な細胞死を引き起こすこと、そして、LIC1 による細胞死制御には、PEN2 による抗菌物質合成が関与することを明らかにした。また、LIC1 が細胞膜に局在すること、LIC1 ホモログと協調して機能することを示した。さらに EDR1 および GSH1 が非宿主抵抗性に関与することを発見した。

研究成果の概要（英文）：

The *Arabidopsis lic1* mutants developed lesions by non-adapted pathogens, and the gene responsible for the mutants encodes a MACPF domain protein with unknown function. In this study, we showed that lesion development in the *lic1* mutants is not due to pathogen entry, indicating that LIC1 is required for regulation of cell death in nonhost defense, and that PEN2-dependent synthesis of anti-microbial metabolite is involved in LIC1-mediated regulation for cell death. We also indicate that LIC1 is localized in plasma membrane, and functions together with LIC1 homologs. Furthermore, we found that EDR1 and GSH1 are involved in nonhost resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：病害抵抗性、非宿主抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 非宿主抵抗性に関する遺伝子レベルの研究の幕開け

非宿主抵抗性は、膨大な病原菌と対峙しなければならない植物が獲得した必須の生存戦略である。強度と持続性を兼ね備えた本抵抗性の耐病性作物育種への応用は、かねてより大きな期待が寄せられているが、その分子メカニズムの理解は非常に乏しい。しかし、近年、欧米のグループによって、オオムギうどんこ病菌（シロイヌナズナを宿主植物としない）に対する非宿主抵抗性が、部分的に崩壊しているシロイヌナズナの *pen* 変異体が分離され、その解析より、*PEN1*（シンタキシン）、*PEN2*（糖質分解酵素）、および *PEN3*（ABC トランスポーター）遺伝子とその原因遺伝子として同定された（Collins *et al.* 2003 Nature 425, 937; Lipka *et al.* 2005 Science 310, 1180; Stein *et al.* 2006 Plant Cell 18, 731）。このことは、多層的で解析が困難であると考えられていた非宿主抵抗性の分子メカニズムも、分子遺伝学的解析などを通じて、1枚1枚そのベールを剥がしていきけることをはっきりさせた。

### (2) 炭疽病菌に対する非宿主抵抗性

申請者は、炭疽病菌とシロイヌナズナを用いて、高等植物が獲得した非宿主抵抗性を支える分子機構の解明に取り組んでおり、本抵抗性が過敏感細胞死に依存しない、侵入阻止型抵抗反応によって成立していることを明らかにしていた（Shimada *et al.* 2006 MPMI 19, 270）。また、上記の *PEN1* 遺伝子は、炭疽病菌に対する非宿主抵抗性には必要ではなく、一方、*PEN2* および *PEN3* は若干の関与をしていることを発見していた。これらの結果は、条件的腐生菌である炭疽病菌に対する非宿主抵抗性に必要な因子は、絶対寄生菌であるうどんこ病菌に対する因子とは、かなり相違があることを示唆している。そこで、申請者は、炭疽病菌への非宿主抵抗性が低下する新たな変異体の分離を試みた。

### (3) *LIC1* の同定

ウリ類炭疽病菌やクワ炭疽病菌を非宿主植物であるシロイヌナズナに接種しても、細胞死を伴わない侵入阻止型抵抗性が発揮されるため、外観としては何の変化も見られない。我々は、EMS 変異処理をおこなったシロイヌナズナ集団に対して、これらの炭疽病菌の接種により、壊死斑が形成されるシロイヌナズナ *lic* 変異体（Lesions induced by nonadapted *Colletotrichum*）をスクリーニングし、複数の *lic* 変異体の分離に成功した。得られた *lic* 変異体は、いずれも野生型植物と見分けがつかないが、病原菌を接種した場

合、特異的に壊死斑が形成される。その中の *lic1* 変異体（*lic1-1*, *lic1-2*）に対するポジショナルクローニングにより、原因遺伝子である *LIC1* の同定に成功した。*LIC1* 遺伝子は、機能未知のタンパク質をコードしていた（未発表データ）。

## 2. 研究の目的

### (1) *LIC1* 遺伝子の生理機能の解析

*lic1* 変異体においては、非宿主抵抗性が部分的に崩壊しているが、その崩壊の詳細は明らかではない。不適応型の炭疽病菌の感染行動、植物の抵抗反応の細胞学解析を通じて、本変異体において非宿主抵抗性のどの過程に欠損が生じているかを明らかにする。

### (2) *LIC1* タンパク質の分子機能の解析

*LIC1* タンパク質は機能未知のタンパク質であり、その細胞内局在性は不明である。レポーター遺伝子を用いて、*LIC1* 遺伝子の発現様式および *LIC1* タンパク質の細胞内局在性を明らかにする。また、*lic1* 変異の分子機能解析をおこなう。さらに *LIC1* タンパク質と相互作用するシロイヌナズナ因子を探索し、その機能解析をおこなう。これらの研究より、*LIC1* の分子機能を解明する。

### (3) *lic* 表現型を示す他の変異体の研究

*lic1* 変異体とは異なる遺伝子に変異を有し、*lic* 表現型を示す変異体の探索をおこなう。変異体が見つかった場合、その原因遺伝子を特定し、その機能を調査する。

### (4) 非宿主抵抗性の多層構造の解析

*lic1* 変異体においては、非宿主抵抗性の崩壊はあくまで部分的なものである。*lic1* 変異体を用いて、非宿主抵抗性の多層構造のアウトラインについて解析する。*lic1* 変異体に対し、*pen2* および *pen3* の変異を導入し、その抵抗性崩壊がさらに進行するかを解析する。また、他の抵抗性（基礎的抵抗性など）に関わる因子の変異体についても、*lic1* 変異体との多重変異体を作成・解析する。さらに、他の *lic* 表現型を示す変異体の解析などより、新規の遺伝子が見つかった場合、それらについても多重変異体を作成・解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) *LIC1* の生理機能の解析

シロイヌナズナを宿主としない不適応型の炭疽病菌を *lic1* 変異体に接種すると、明確な壊死斑を形成するが、アブラナ科炭疽病菌（シロイヌナズナに感染する）とは異なり、壊死斑の拡大は観察されない。したがって、*lic1* 変異体における非宿主抵抗性の崩壊は、

部分的なものであると考えられる。*lic1* 変異体における抵抗性崩壊の詳細を明らかにするため、変異体における炭疽病菌の感染行動の詳細を細胞学的に解析し、病原菌の感染行動のどのステップが、*lic1* 変異体において壊死斑形成を引き起こすのかを特定する。

#### (2) LIC1 の時空間制御の解析

LIC1 タンパク質の細胞内局在は明らかではない。LIC1 タンパク質のカルボキシル末端に GFP を融合したタンパク質が同因子のプロモーター下で発現するコンストラクトを作成し、*lic1* 変異体に導入することにより相補性をテストする。

#### (3) LIC1 の相互作用因子のスクリーニング :

LIC1 の分子機能解析のために、酵母 two-hybrid システム (GAL4 システム) を用いて LIC1 と相互作用するシロイヌナズナ因子を調査する

#### (4) *lic* 表現型を示す他の変異体の研究

既存の病害抵抗性変異体 (非宿主抵抗性と関連の報告はないもの) について、不適応型炭疽病菌の接種により *lic* 表現型を示すものをスクリーニングする。

#### (5) 多重変異体解析

*PEN2* および *PEN3* 遺伝子への変異は、炭疽病菌への非宿主抵抗性に若干の影響を与える。この *PEN2*-*PEN3* 経路と LIC1 の関係を明らかにするために、*lic1pen2* および *lic1pen3* 二重変異体を作成する。あわせて、炭疽病菌への非宿主抵抗性について明確な変化が見出されなかった既存の病害抵抗性変異体 (*pad4*, *eds1*, *rbohD*, *rbohF* を含む) についても、*lic1* 変異体との二重変異体を作成する。

### 4. 研究成果

研究代表者のグループが同定したシロイヌナズナの非宿主抵抗性に関与する遺伝子 *LIC1* を中心に、本研究を推進した。

#### (1) 非宿主抵抗反応時の細胞死制御と LIC1

シロイヌナズナを宿主としない炭疽病菌 (不適応菌) は、野生型シロイヌナズナに対しては見た目上、何の変化も引き起こさないのに対し、*lic1* 変異体に対しては明確な壊死斑を形成する。まず、*lic1* 変異体上における不適応菌の感染行動の詳細を調査した。その結果、不適応型菌は、本変異体において侵入率の上昇を示さなかった。この結果は、抗菌物質生産に関わる *PEN2* 遺伝子の変異体において、顕著な侵入率の上昇が見出されるのとは対照的であった。したがって、*lic1* 変異体の壊死斑は、菌侵入に依存するのではなく、抵抗

反応時の細胞死の抑制能の欠損によると推定された。一方で、不適応型の炭疽病菌の *pen2* 変異体への侵入行動の詳細を調査した結果、炭疽病菌がメラニン化した付着器を介さない、新規の侵入機構 (hyphal tip-based entry: HTE と命名) を有することを発見した。

#### (2) *lic1* 依存的細胞死とサリチル酸経路

*lic1* 変異体における壊死斑形成 (細胞死) は、*pad4* や *eds16* 変異の導入によって部分的に抑制され、*lic1* 変異依存的な細胞死には、サリチル酸経路が関与していることが判明した。

#### (3) *lic1* 依存的細胞死と抗菌物質経路

驚くべきことに、*lic1* 変異体に対して、*pen2* 変異を導入した結果、*lic1* 変異依存的な細胞死が部分的に抑制されることが明らかとなった。さらに *PEN2* 関連抗菌物質を排出すると推定されている ABC トランスポーター遺伝子 *PEN3* の変異を *lic1* 変異体に導入した。その結果、*lic1 pen3* 二重変異体においては、*lic1* 単独変異体と比較して、さらに壊死斑形成が激しくなることが判明した。この結果は、*PEN2* がその合成に関与する抗菌物質の蓄積が、*lic1* 変異体における細胞死に関与していることを強く示唆した。*PEN3* がコードする ABC トランスポーターは、*f1g22* 処理時のカロース合成に必要であることが報告されており、*PEN3* が *PEN2* 関連抗菌物質を排出することにより、カロース合成が誘導されることが示唆されている。*f1g22* 処理時のカロース合成を *lic1* 変異体で調べた結果、*pen3* 変異体とは異なり、そのカロース合成は誘導され、LIC1 は *f1g22* 処理時における *PEN2* 関連抗菌物質の排出には必須ではないことが示唆された。また、*lic1 pad3* 変異体の解析より、*lic1* 表現型へのカマレキシンの関与の度合いは低いことが明らかになった。

#### (4) GFP を用いた LIC1 の発現・局在解析

LIC1 と GFP の機能的な融合タンパク質遺伝子を LIC1 プロモーター下で発現させた結果より、LIC1 の細胞膜への局在が示唆された。また、LIC1 の発現は不適応型炭疽病菌の接種により誘導されたとを明らかにした。

#### (5) *LIC1* の相同遺伝子の機能解析

*LIC1* の 2 種類の相同遺伝子について、欠損変異体を分離し、不適応型炭疽病菌を接種したが、*lic1* 表現型は観察されなかった。しかし、*lic1* 変異体に相同遺伝子の変異を導入した結果、*lic* 表現型が助長されることが見出された。さらに、酵母ツーハイブリットアッセイより、LIC1 と相同タンパク質の相互作用を示唆する結果を得ている。これらの結果より、動物の MACPF タンパク質のように、LIC1 と LIC1 の 2 種類の相同タンパク質は、複合体を

形成し協調的に機能していると推定された。

#### (6) EDR1 の非宿主抵抗性への関与

EDR1 と呼ばれる遺伝子の変異体が、*lic* 表現型を示すことを発見した。*edr1* 変異体では、*lic1* 変異体とは異なり、不適応型菌が侵入することで壊死斑形成が引き起こされていた。さらに、*edr1 pen2* 二重変異体を作成・解析した結果、EDR1 は PEN2 とは独立して、非宿主抵抗性における侵入阻止に貢献していることを明らかにした。そこで、EDR1 により制御される因子を探索するために、*edr1* 変異体について、マイクロアレイ解析を実施した結果、ディフェンシンと呼ばれる抗菌タンパク質をコードする遺伝子の発現が、この *edr1* 変異体において著しく低下していることが明らかとなった。この *edr1* 変異体におけるディフェンシンの発現が、*MYC2* と呼ばれる転写因子をコードする遺伝子の変異を導入した場合、復帰することを発見した。また、この *edr1 myc2* 二重変異体においては、*edr1* 変異体と比較して、非宿主抵抗性が回復していることを明らかにした。さらに、ディフェンシン遺伝子を *edr1* 変異体において恒常的に発現させた場合も、その抵抗性の回復が起きることを見出した。これらの結果より、炭疽病菌への非宿主抵抗性には、抗菌タンパク質であるディフェンシンの EDR1 を介した発現誘導が必要であることを明らかにした。

#### (7) GSH1 の非宿主抵抗性への関与

グルタチオン生合成に必要な  $\gamma$ -グルタミルシステインシンセターゼ遺伝子をコードする *GSH1* の変異体が *lic* 表現型を示すことを発見した。*GSH1* に変異を有する *pad2* 変異体では、不適応型炭疽病菌であるクワ炭疽病菌の侵入率の上昇が見出され、さらに変異体では接種時におけるグルタチオン含量が顕著に低下していた。この結果より、侵入阻止型抵抗性への *GSH1* 依存的なグルタチオン合成の関与が強く示唆された。興味深いことに、*pad2* 変異体においては侵入菌糸が接種部位を越えて伸長していた。さらに、トリパンブルー染色より、*edr1* 変異体あるいは *pen2* 変異体の接種部位において見られる細胞死が、*pad2* 変異体では顕著に弱まっていることが示唆された。この結果より、*GSH1* 依存的なグルタチオン生合成が、侵入阻止型の非宿主抵抗性に加えて、侵入後の過敏反応に必要であることが明らかになった。

本研究により、*LIC1* がコードする MACPF タンパク質の抗菌反応における役割をはじめて発見することができた。本研究は、抗菌物質自体が植物細胞死を誘導すること、さらに、MACPF タンパク質がこの細胞死誘導について抑制機能を有することを示しており、本成果

は非宿主抵抗性のみならず、植物の細胞死研究においても大きなインパクトを与えると考えられる。今後、この *LIC1* がどのように抗菌反応時の細胞死制御を実行しているのか、本因子、および、そのホモログに対して、より詳細な分子的研究をおこない明らかにしていきたい。また、本研究で、新たに EDR1 および *GSH1* が、不適応炭疽病菌に対する侵入阻止型抵抗性に関与していることを発見した。本成果は想定されていた非宿主抵抗性の重層性を実証したものである。また、興味深いことに *GSH1* は侵入後の抵抗性においても重要な役割を果たしていることを明らかにしており、今後、侵入後の抵抗性における過敏反応にグルタチオンがどのような役割を果たしているのかについて、更に研究していく予定である。

#### 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 6 件)

1. Hiruma, K., Nishiuchi, T., Kato, T., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., and Takano, Y., *Arabidopsis ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1* is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, and acts through interference of MYC2-mediated repressor function, *Plant Journal*, 査読有、2011, 67, 980-992, DOI: [10.1111/j.1365-3113.2011.04651.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04651.x).
2. Hiruma, K., and Takano, Y., Roles of EDR1 in non-host resistance, *Plant Signaling & Behavior*, 査読有, 2011, 6, 1831-1833, DOI: [10.4161/psb.6.11.17494](https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17494)
3. 晝間 敬、吉野香絵、高野義孝、植物病原性カビの新たな侵入戦略 化学と生物、査読無、2011、49、588-599、DOI: [10.1271/kagakutoseibutsu.49.588](https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.49.588)
4. Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., and Takano, Y., Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in *Arabidopsis* for nonhost resistance against anthracnose pathogens, *The Plant Cell*, 査読有, 2010, 22, 2429-2443, DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110>.
5. 高野義孝、植物病原性カビの感染戦略、生物の科学 遺伝、査読無、2010、64、20-25。  
<http://www.nts-book.co.jp/item/detail>

[1/summary/bio/20051225\\_42.html](http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.060996)

6. Asakura, M., Ninomiya, S., Sugimoto, M., Oku, M., Yamashita, S., Okuno, T., Sakai, S., and Takano, Y., Atg26-mediated pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*, The Plant Cell, 査読有, 2009, 21, 1291-1304, DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.060996>.
- [学会発表] (計 11 件)
1. 福永 聡、十亀美穂、小野澤 (小森) 真理子、奥野哲郎、高野義孝、非宿主抵抗反応における細胞死制御に関するシロイヌナズナの LIC1/NSL1 の研究、日本植物病理学会大会、2012 年 3 月 28 日、福岡国際会議場 (福岡)
  2. 晝間敬、奥野哲郎、高野義孝、グルタチオン合成酵素 GSH1 は、クワ炭疽病菌に対する非宿主抵抗性に必要である、日本植物病理学会関西西部会、2011 年 10 月 1 日、サンポートホール高松 (香川)。
  3. 渡邊智史、奥野哲郎、高野義孝、シロイヌナズナの非宿主抵抗反応における抗菌タンパク質の分泌制御に関する研究、日本植物病理学会関西西部会、2011 年 10 月 1 日、サンポートホール高松 (香川)
  4. 渡邊智史、晝間敬、奥野哲郎、高野義孝、炭疽病菌に対するシロイヌナズナの非宿主抵抗反応におけるディフェンシンの分泌制御、平成 23 年度日本植物病理学会大会、2011 年 3 月 27 日、東京農工大 (東京都)。
  5. Hiruma, K., Nishiuchi, T., Kato, T., Okuno, T., and Takano, Y. Arabidopsis EDR1 is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, 21th International Conference on Arabidopsis Research, 6 June 2010, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan
  6. Sogame, M., Onozawa, M., Saitoh, H., Terauchi, R., Okuno, T., and Takano, Y. *LIC1* is involved in cell death regulation during nonhost defense response of *Arabidopsis thaliana*, International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, July 19, 2009, Quebec, Canada.
  7. Hiruma, K., Nishiuchi, T., Kato, T., Asano, T., Okuno, T., and Takano, Y. EDR1 positively regulates nonhost defense response independently of PEN2, International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, July 19-23,

2009, Quebec, Canada.

8. Asakura, M., Ninomiya, S., Sugimoto, M., Oku, M., Yamashita, S., Okuno, T., Sakai, Y., and Takano, Y. Atg26-enhanced pexophagy is required for host invasion by the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*, International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, July 19-23, 2009, Quebec, Canada.
9. 晝間敬、西内巧、加藤智朗、浅野智哉、奥野哲郎、高野義孝、EDR1 は PEN 2 に依存しない非宿主抵抗反応を正に制御している、日本植物病理学会大会、2009 年 3 月 27 日、山形県生涯学習センター。
10. 小野澤真理子、十亀美穂、斉藤宏昌、寺内良平、奥野哲郎、高野義孝、*LIC1* 遺伝子は非宿主抵抗反応における細胞死制御に関与している、日本植物病理学会大会、2009 年 3 月 27 日、山形県生涯学習センター。
11. 晝間敬、小野澤真理子、Volker Lipka、奥野哲郎、Paul Schulze-Lefert、高野義孝、炭疽病菌に対するシロイヌナズナの非宿主抵抗性における PEN2 要求性の研究、日本植物病理学会関西西部会、2008 年 9 月 26 日、和歌山ビッグ愛

#### 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：