

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間	2021～2025
課題番号	21H05032
研究課題名	エフェクターに基づく植物病原菌の宿主特異性成立の分子基盤解明と応用展開
研究代表者氏名（ローマ字）	高野 義孝（TAKANO Yoshitaka）
所属研究機関・部局・職	京都大学・農学研究科・教授
研究者番号	80293918

研究の概要：

多くの植物病原菌の宿主特異性の成立には、エフェクターと総称される分泌タンパク質群が重要な役割を果たしているが、その分子基盤は不明である。本研究では、先駆的に発見に成功している、宿主特異性成立に必須であるエフェクターの解析を起点に、エフェクターを介した病原菌の宿主特異性成立の分子基盤を解明することを目的とし、さらにその成果に基づき新たな耐病性作物の創出技術開発を志向する。

研究分野：植物病理学、植物病原菌、病害抵抗性

キーワード：宿主特異性、エフェクター、非宿主抵抗性、植物病原菌

1. 研究開始当初の背景

一般に動植物の感染症において、病原体は明確な「宿主特異性」を示す。しかし、病原体の宿主特異性がどのように成立しているのか、その分子的背景の理解は極めて限定的である。植物感染症の被害の70%以上は、植物病原性の糸状菌（以下、植物病原菌）によって引き起こされている。そして、多くの植物病原菌の宿主特異性の成立には、「エフェクター」と総称される分泌タンパク質群が決定的な役割を果たしていると推定される。エフェクターは病原菌が分泌後、宿主細胞内に移行して、その防御機構を攪乱し、これにより宿主植物は制圧される。しかし、エフェクターによりどのように植物感染症における宿主特異性が成立するのかは、不明である。

2. 研究の目的

本研究では、我々が先駆的に発見に成功している、ウリ類炭疽病菌のウリ科作物への宿主特異性成立に必須である3種の病原菌エフェクター（EPC1、EPC2、EPC3と命名）の分子構造機能解析を起点に（図1）、エフェクターを介した植物病原菌の宿主特異性成立の分子基盤を解明することを目的とする。さらに本成果に基づき、このEPCエフェクターの戦略を遮断し、永続的耐病性を示す次世代型作物の創出技術開発を志向する。

3. 研究の方法

1) EPCエフェクターの構造・機能解析

各EPCエフェクターの植物免疫抑制能を明らかにする。続いて、EPCエフェクタータンパク質の立体構造をNMR解析により決定する。決定した立体構造から、EPCエフェクターのアミノ配列から見出せない特徴的構造、機能ドメインを探索し、本エフェクターの分子機能に迫る。

2) EPCエフェクターの標的因子の同定・解析

エピトープタグを付加したEPCエフェクターを植物細胞において一過的に発現させ、続いて免疫沈降解析を実施し、共沈降してくるタンパク質について、LC-MS/MS解析を実施し、標的因子候補をリスト化する。LC-MS/MS解析により見出された候補については、当該EPCエフェクターとの結合を調査する。続いて、EPCエフェクターが結合する標的因子について、当該因子をコードする遺伝子に対するウイルス誘導遺伝子サイレンシングをおこない、標的因子の病害抵抗性システムにおける貢献、役割を明らかにする。

3) 宿主特異性成立に関わるエフェクターの網羅化

ウリ科作物への宿主特異性に関わるエフェクターを網羅化するために、ウリ類炭疽病菌とオービクラクレード内の別種に対する比較オミクス解析による候補選抜、続く標的遺伝子破壊解析を実施する（多重破壊を含む）。

4) 標的因子のエフェクター耐性型への改変

EPCエフェクターと同定されたEPCエフェクターの標的因子について、その複合体構造を予測、決定し、その構造情報に基づく変異導入により、EPCエフェクター耐性型の標的因子を開発する。

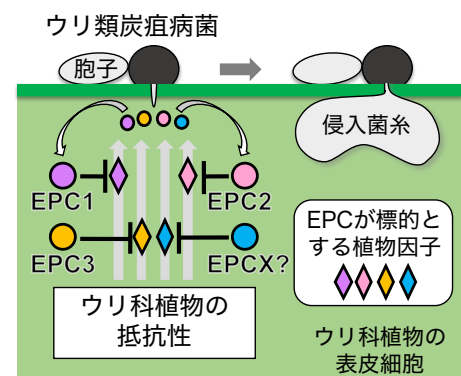


図1. ウリ類炭疽病菌のEPCエフェクターによるウリ科植物の抵抗性抑制の概念図。

#### 4. これまでの成果

##### 1. EPC エフェクターの機能・構造解析

エフェクターEPC1、EPC2、EPC3 をベンサミアナタバコ葉に一過的に発現させ、その発現が同植物の PAMP 誘導免疫に与える影響を調べた。その結果、EPC1、EPC2、EPC3 いずれも、細菌の PAMP (flg22) が引き起こす活性酸素生成を抑制することを明らかにした。これらの結果より、エフェクターEPC1、EPC2、EPC3 はいずれも PAMP 誘導免疫の上流経路を抑制する活性があることが明らかとなった。

##### 2. EPC エフェクターの構造解析

エフェクターEPC3 について、全長タンパク質の発現を試みた結果、発現タンパク質はほとんど可溶化しなかった。一方、立体構造予測に基づき抽出した EPC3 の特定の領域について、まず、その領域のみで免疫抑制機能が保持されていることを明らかにした。さらにその特定領域のタンパク質を発現させた場合は、発現タンパク質が可溶化することを見出しており、現在、NMR 解析による立体構造決定を試みている。

##### 3. EPC エフェクター標的因子の同定・解析

エピトープタグを付加した EPC1、EPC2、EPC3 をベンサミアナタバコ葉およびメロン子葉に一過的に発現させ、続いて免疫沈降解析を実施し、共沈降してくるタンパク質について、LC-MS/MS 解析を実施し、標的因子候補のリスト化を完了した。さらに EPC1 に関しては標的候補の解析より、EPC1 が免疫関連キナーゼを標的にしていることを示唆する結果を得ている。

##### 4. 新規エフェクターEPC4 の発見

ウリ類炭疽病菌の複数菌株に対する RNA シークエンスデータに基づき、本菌の病原性エフェクター候補を選抜し、続いて、標的遺伝子破壊により候補遺伝子の破壊株を作成した。その結果、破壊株がキュウリへの病原性の低下を示す新規のエフェクター遺伝子を発見し、本遺伝子を EPC4 と命名した。

##### 5. EPC 遺伝子の多重破壊株の作出、解析 (図 2)

同定に成功している病原性エフェクター EPC1、EPC2、EPC3、EPC4 遺伝子の単一破壊株はキュウリに対する病原性は低下するが、その病原性は依然として一定程度保持されている。そこで、4 遺伝子をすべて破壊した株を作成した。その結果、4 重遺伝子破壊株はキュウリ、メロンに対する病原性をほとんど完全に失う一方、ベンサミアナタバコへの病原性は野生株と同等であった。これらの結果より、この 4 種の EPC 遺伝子は、ウリ類炭疽病菌のキュウリ、メロンなどのウリ科作物に対する宿主特異性において決定的な役割を果たしていることが明らかとなった。

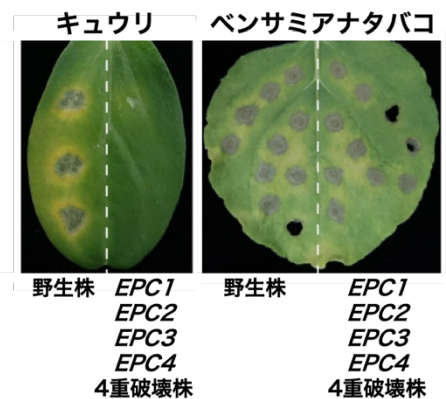


図 2. ウリ類炭疽病菌の EPC 遺伝子の 4 重破壊株の病原性試験。

#### 5. 今後の計画

引き続き EPC エフェクターの植物免疫能を調査するとともに、その標的因子を同定し、EPC エフェクターの分子機能を明らかにしていく。また、EPC3 を中心に EPC エフェクターの立体構造解析を推進し、EPC エフェクターの分子機能を構造面からも理解していく。また、同定に成功している標的因子に関しても立体構造解析を推進し、エフェクター耐性型への改変のための基盤情報を獲得する。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- Inoue Y, (7 名省略), Takano Y. Selective deployment of virulence effectors correlates with host specificity in a fungal plant pathogen. *New Phytologist*, in press. (2023).
- Takano Y, (6 名省略). Nonhost resistance and effectors in interactions between *Colletotrichum* species and plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 125:1019820 (2023).
- Yamada K, Yamamoto T, Uwasa K, Osakabe K, Takano Y. The establishment of multiple knockout mutants of *Colletotrichum orbiculare* by CRISPR-Cas9 and Cre-loxP systems. *Fungal Genet Biol*, 165:103777 (2023).
- Kato H, (14 名省略), Takano Y, Terauchi R. Recognition of pathogen-derived sphingolipids in *Arabidopsis*. *Science*, 376:857-860 (2022).
- Zhang R, (8 名省略), Ohki S, Takano Y. Fungal effector SIB1 of *Colletotrichum orbiculare* has unique structural features and can suppress plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *J. Bio. Chem*, 297:101370. (2021).
- Singkaravanit-Ogawa S, (6 名省略), Takano Y. *Arabidopsis* CURLY LEAF functions in leaf immunity against fungal pathogens by concomitantly repressing *SEPALLATA3* and activating *ORA59*. *Plant J*, 108:1005-1019 (2021).
- 高野義孝 2022 年度日本植物病理学会賞

#### 7. ホームページ等

<https://www.plant-pathology.kais.kyoto-u.ac.jp>