

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292028

研究課題名(和文)病原性糸状菌の感染プライミングを誘導する植物由来の未知因子の解析

研究課題名(英文) Identification of plant factors which evoke an immune evasion mechanism in fungal plant pathogens

研究代表者

西村 麻里江 (Nishimura, Marie)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域・上級研究員

研究者番号：30370670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原菌は植物難分解性多糖の  $\beta$ -1,3-グルカンを感染時の菌体表面に蓄積することにより植物免疫による細胞壁への攻撃を抑えて感染の準備(感染プライミング)をする。本研究から緑色植物が一般に持っているルテイン(フラボノイド)が多犯性植物炭疽病菌に対して感染プライミングを誘導することが明らかになった。ルテインと構造類自体である  $\beta$ -カロテンにはプライミング活性がなく、本菌にはこの2化合物の構造の違いを認識する機構があると推測される。また宿主の異なる植物炭疽病菌や殺生性病原菌であるイネゴマ葉枯病菌もルテインに応答した。総合的に、菌の宿主域や感染様式と感染プライミング因子には相関性があることが推測される。

研究成果の概要(英文)：Various fungal plant pathogens mask their cell wall surfaces with  $\beta$ -1,3-glucan to evade plant immunity. This  $\beta$ -1,3-glucan accumulation may be induced by factors released from plants. Through this study, we showed that lutein, a plant carotenoid involved in photosynthesis, induced surface  $\beta$ -1,3-glucan accumulation in the polyphagous fungi *Colletotrichum fioriniae*. This fact would explain the reason why this fungus is capable of infecting various plants. Other *Colletotrichum* species and necrotrophic *Bipolaris oryzae* also responded to lutein to accumulate surface 1,3-glucan. These fungi did not respond to  $\beta$ -carotene, a structurally similar compound of lutein, suggesting that the fungi have mechanisms to recognize difference in chemical structures. It is possible to think that fungal plant pathogens prepare for host immune evasion by recognizing specific host factor(s), which these pathogens encounter during infection.

研究分野：応用微生物学

キーワード：植物-微生物間相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

植物には、侵入菌の細胞壁構成多糖(糸状菌の場合はキチンやグルカンなど)の分解物や分泌タンパク質などの「非自己」分子(PAMPs: pathogen-associated molecular patterns)により菌を認識して排除する免疫機構(PTI: pattern-triggered immunity)がある。しかし、植物病原菌はPTIを回避して感染することができる。

これまでに研究代表者はイネ科植物の重要な病原性糸状菌であるイネいもち病菌(*Pyricularia oryzae*)の感染機構の研究から、*P. oryzae*はイネが分解できない多糖である-1,3-グルカンで感染時の細胞壁表面に蓄積することにより菌体を保護すると同時に、細胞壁PAMPsを覆い隠してイネのPTIによる認識そのものを妨害することを見出した(Fujikawa et al., PLoS Pathogens, 2012)。さらに、いもち病菌と進化上非常に遠い関係にあるイネゴマ葉枯病菌(*Bipolaris oryzae*)やイネ紋枯病菌(*Rhizoctonia solani*)などの植物病原性でも同様に、-1,3-グルカンで細胞壁を覆い隠すことによりPTIを回避していることを明らかにした(Fujikawa et al., PLoS Pathogens, 2012)。植物ゲノム情報から-1,3-グルカンはイネ以外の多くの植物にとっても難分解性であることが示唆されており、多くの病原性糸状菌において-1,3-グルカンがこれらのイネ科病原性糸状菌と同様の方法でPTI回避に利用されている可能性は高い。

興味深いことに、これらの病原性糸状菌の細胞壁が常に-1,3-グルカンで覆い隠されているわけではない。例えばイネいもち病菌では植物ワックス構成成分の1つである1,16-hexadecanediolの認識によって-1,3-グルカンの生合成が誘導される(Fujikawa et al., Mol. Microbiol., 2009)。さらに研究代表者らは*B. oryzae*、イネ紋枯病や多犯性の炭疽病菌でも未知の宿主植物由来の成分による-1,3-グルカンの細胞表面への蓄積を観察しており、これらの知見から、病原性糸状菌は何らかの宿主植物の因子を認識すると-1,3-グルカンの細胞表面への蓄積などにより、感染時の宿主PTIによる攻撃に備える(感染プライミングする)と推測した。

### 2. 研究の目的

宿主植物のPTIからの回避は病原菌にとって感染成立に必須である。本研究は、どのような植物側の因子が病原性糸状菌のPTI回避機構を誘導しているのかを明らかにすることを目的として行った。

もし植物側の因子が病原菌の感染プライミングを誘導しているのであれば、広い宿主範囲を持つ多犯性病原菌に作用する感染プライミング因子は、宿主範囲が限定されている病原菌のものと比較して、植物でより普遍

的に存在する化学物質であると推測される。もし宿主範囲の異なる菌がどのような植物因子に反応して感染プライミングするのかが明らかになれば、病原性糸状菌の宿主特異性決定機構に関与する新たなファクターとして感染プライミング因子をとらえることができる。これは植物-病原性糸状菌相互作用に新たな概念を導入することにつながる可能性がある。

以上をふまえ、イネ病原性糸状菌の*P. oryzae*および多犯性の植物炭疽病菌(*Colletotrichum*属菌)等をモデルに用いて感染プライミングを誘起する宿主植物由来の未知因子の特定を行い、さらに特定された感染プライミング因子に対する各菌の応答、植物における分布と菌の宿主範囲の相関性などの解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) バイオアッセイ誘導分画法による感染プライミング因子の単離と同定

多犯性の植物炭疽病菌(*Colletotrichum fioriniae*)への-1,3-グルカンの蓄積誘導を指標として植物由来の感染プライミング因子の探索を行った。プレリミナリーな実験結果としてニンジン片が*C. fioriniae*に-1,3-グルカン蓄積を誘導することが見出されていたため、ニンジン葉とニンジン根を物質の探索源として用いた。凍結乾燥した植物体を有機溶媒等により分画し、それぞれの画分の-1,3-グルカン誘導活性をスライドガラス上で培養した菌体に添加して蛍光抗体染色を行った後に顕微鏡下で蛍光を確認した。-1,3-グルカン蓄積上昇活性を示した画分は高速液体クロマトグラフィー等によりさらに分画・精製を進めた。精製物は最終的にNMRやMS等の機器分析に供し、その化学構造を解析した。

(2) 感染プライミング因子に対する病原性糸状菌の応答解析

上記方法で特定した感染プライミング因子を用いて、*C. fioriniae*と異なる宿主を好む植物炭疽病菌(*Colletotrichum*属菌)に対するプライミング活性を評価した。さらに宿主植物域がイネ科に特定されている*P. oryzae*と*B. oryzae*に対するプライミング活性も評価した。プライミング活性はスライドガラス上で培養した菌系の-1,3-グルカン蓄積誘導の観察、もしくは(ゲノム情報が明らかになっている場合には)RT-PCRによる-1,3-グルカン生合成遺伝子の発現解析により評価を行った。

また既に*P. oryzae*に対して感染プライミング活性を示すことが明らかになっている1,16-hexadecanediolに対する*C. fioriniae*と*B. oryzae*の応答を確認した。

(3) 感染プライミング因子の構造類似化合物に対する病原性糸状菌の応答解析  
感染プライミング因子に構造が類似の化合物を用いて、細胞壁表面への-1,3-グルカ

ン蓄積誘導を指標に感染プライミング活性を評価した。解析には *B. oryzae*, *P. oryzae*, および *C. fioriniae* をモデルに用いた。

研究推進にあたり、下記の菌株について農研機構ジーンバンクより分譲を受けた。*C. fioriniae* (MAFF 306551), *B. oryzae* (MAFF 305425), *C. chrysanthemi* (MAFF 239363), *C. orbiculare* (MAFF 240422), *C. godetiae* (MAFF 241297), *C. gloeosporioides* (MAFF 306533)。

#### 4. 研究成果

(1) *C. fioriniae* に -1,3-グルカン蓄積誘導活性を示すニンジン葉由来の因子の単離・同定

図1に示すストラテジーでニンジン葉の hexane 相から強い -1,3-グルカン蓄積誘導活性を呈する化合物を単離した。<sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR スペクトル解析により lutein と stigmasterol を活性物質として同定した。

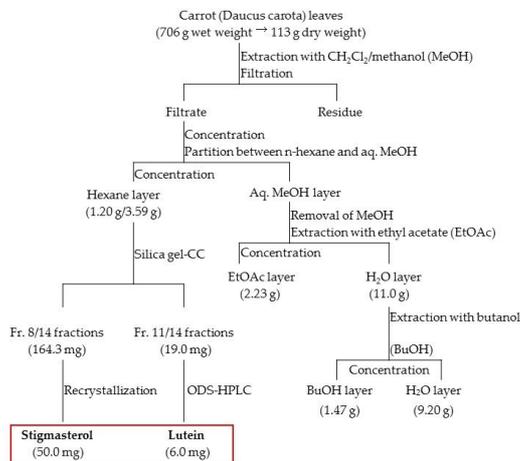


図1. バイオアッセイ誘導分画法によるニンジンの葉由来の感染プライミング因子の単離・同定

細胞壁表層への -1,3-グルカン蓄積誘導を指標に単離を行った。(Otaka et al., Molecules 21:980, 2016)より改変)

(2) lutein と stigmasterol の多犯性植物炭疽病菌 *C. fioriniae* に対する活性

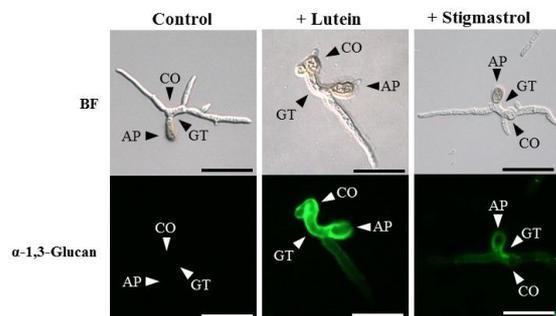


図2. *C. fioriniae* に対する lutein と stigmasterol の -1,3-グルカン蓄積誘導菌系に lutein (10 $\mu$ M) および stigmasterol

(50 $\mu$ M) を添加後、12 時間培養した。上：明視野画像、下： -1,3-グルカンの蛍光抗体染色画像。Co：分生子、Ap：付着器、GT：発芽管 (Otaka et al., 2016 より転載)

lutein や stigmasterol の培地への添加により *C. fioriniae* の菌系で -1,3-グルカンの存在を示す強い蛍光が観察された(図2)。Lutein は stigmasterol より *C. fioriniae* に対して強い活性を示した。

本観察では非固定のサンプルに対して蛍光抗体染色法を用いて -1,3-グルカンを検出していることから、本法では表層に蓄積した -1,3-グルカンが蛍光として検出されていると考えられる。

さらに *C. fioriniae* に対する lutein の -1,3-グルカン誘導活性を -1,3-グルカン合成遺伝子の発現から解析した。培養開始3時間後に10 $\mu$ M の lutein 添加区では無添加区に比べ、 -1,3-グルカン合成遺伝子の発現がまた2倍以上になることが確認された。

(3) 宿主域の異なる植物炭疽病菌の lutein に対する応答

主に感染する植物が異なる植物炭疽病菌のいずれにおいても lutein による -1,3-グルカン蓄積が見られた(図3)。ただし、*C. orbiculare* では -1,3-グルカンの存在を示す蛍光の強度が他と比較して弱かった(図3)。

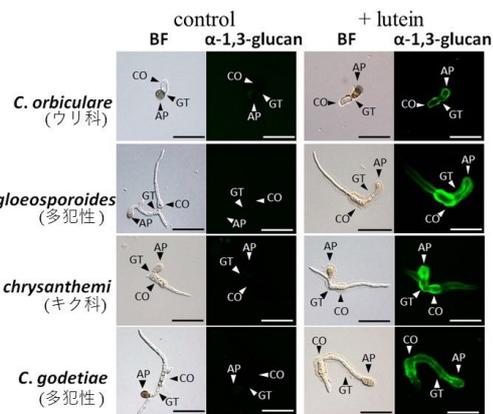


図3. *Colletotrichum* 属菌に対する lutein の -1,3-グルカン蓄積誘導活性

*Colletotrichum* 属菌では lutein (25 $\mu$ M) に応答して -1,3-グルカンを蓄積した。それぞれの菌が主に感染する植物種はカッコ内に記載。左：明視野画像、右： -1,3-グルカンの蛍光抗体染色画像。Co：分生子、Ap：付着器、GT：発芽管 (Otaka et al., 2016) より転載)

(4) 植物炭素病菌とイネ病原性糸状菌における植物因子への応答性の比較

イネ病原性糸状菌の lutein への応答を -1,3-グルカンの蓄積誘導活性から解析した。図4に示すように、lutein は *B. oryzae* に対しても -1,3-グルカン誘導活性を示したが、

*P. oryzae* に対しては活性を示さなかった。また、1,16-hexadecanediol (植物ワックスの成分) は *P. oryzae* に対して -1,3-グルカン蓄積誘導活性を持つが、*C. fioriniae* および *B. oryzae* に対しては濃度に関わらず活性を示さなかった。

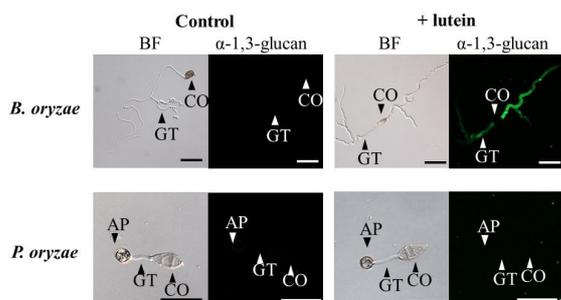


図4 . イネ病原性糸状菌に対する lutein(25μM)の -1,3-グルカン蓄積誘導活性  
左：明視野画像、右： -1,3-グルカンの蛍光抗体染色画像。Co：分生子、Ap：付着器、GT：発芽管 (Otaka et al., 2016 より転載)

#### (5) 構造類似化合物に対する応答

lutein と  $\beta$ -carotene、stigmasterol と ergosterol はそれぞれ似た構造を持つ化合物であるが、*C. fioriniae* および *B. oryzae* は lutein と  $\beta$ -carotene で異なる応答を示した (表1)。この結果は、これらの菌において、lutein と  $\beta$ -carotene の化学構造の違いを認識するシステムがあることを示唆する。これに対して、いずれの菌も stigmasterol および ergosterol に対しては同程度の -1,3-グルカン蓄積誘導活性を示した。-1,3-グルカンの合成誘導は細胞壁や細胞膜へのストレスで誘導されることが知られている (Levin, 2011)。sterol は細胞膜を構成する脂質であり、培地への添加によりこれらの糸状菌の細胞膜に何らかの刺激が加わり (例えば膜への挿入など) 結果として -1,3-グルカンの合成が誘導された可能性が高い。

表1 . -1,3-グルカン蓄積誘導活性

	<i>C. fioriniae</i>	<i>B. oryzae</i>	<i>P. oryzae</i>
Lutein	○		×
$\beta$ -carotene	×	×	×
Stigmasterol		○	○
Ergosterol		○	○

○：活性高い、○：活性有り、×：活性なし

#### (6) 細胞壁表層の -1,3-グルカンの機能

植物の防御応答の1つにキチナーゼやグルカナーゼなどの糸状菌の細胞壁分解酵素の分泌があげられる。*M. oryzae* では植物ワックスの認識により -1,3-グルカンの生合成が誘導され、細胞壁表層に蓄積した -1,3-グルカンがこれらの酵素から細胞壁を

保護するとともに結果的に PAMPs の生産を遅延させる (Fujikawa et al., 2009)。また、*B. oryzae* でも -1,3-グルカンの細胞壁表層への蓄積が菌体保護と菌の感染成功に重要な役割を持つことが示唆されている (Fujikawa et al., 2012)。

Lutein 添加により -1,3-グルカン合成が誘導された *C. fioriniae* の菌糸を細胞壁分解酵素で処理したところ、lutein 無添加の菌糸よりも細胞壁の分解が優位に抑制された。この結果は、*C. fioriniae* においても lutein により誘導された -1,3-グルカンは細胞壁表層に蓄積され、抗菌酵素などから細胞壁を保護していることを示す (図5)。

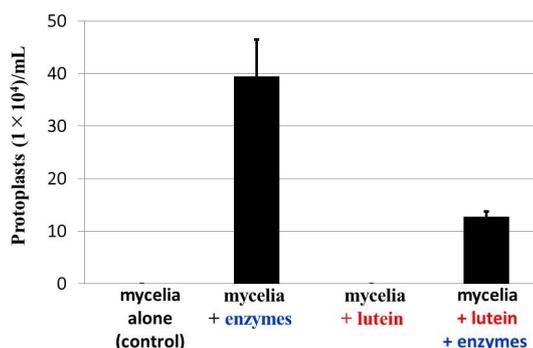


図5 . *C. fioriniae* における -1,3-グルカンの細胞壁蓄積による抗菌酵素への耐性  
Lutein 添加後 24 時間培養した菌体をウスキザイム(0.5mg/mL)で 24 時間処理後、生成したプロトプラスト数を比較した。Lutein 添加区ではプロトプラスト化が抑制される。(Otaka et al., 2016 を改変)

#### (6) まとめと考察

本研究から、*C. fioriniae* に対して lutein や ergosterol が細胞壁表層への -1,3-グルカン蓄積誘導活性を持つ植物因子であることが明らかになった。また、*M. oryzae* や *B. oryzae* 同様、*C. fioriniae* においても細胞壁表層に蓄積した -1,3-グルカンが抗菌酵素からの菌体保護の機能を持つことが示された。このことから細胞壁への -1,3-グルカンの蓄積が *C. fioriniae* の感染に重要な役割を持つことが推測される。これらの結果から lutein や ergosterol が *C. fioriniae* などの菌に対して感染プライミング因子として機能していることが示唆される。

表2 . 研究に用いた菌と感染様式

	感染様式	宿主植物
<i>C. fioriniae</i>	hemibiotroph	多犯性
<i>B. oryzae</i>	necrotroph	イネ科
<i>P. oryzae</i>	hemibiotroph	イネ科

lutein は緑色植物の光合成関連カロテノイドである。*C. fioriniae* のような多犯性の病原菌は植物でより普遍的に存在する化学物質を感染プライミング因子として認識す

るという本研究の前提となった仮説をサポートする結果であるといえる。しかしながら、*Colletotrichum* 属菌に比べて宿主範囲が狭い、イネ科植物に感染する菌である *B. oryzae* も弱いながらも lutein に応答したことを検討する必要がある (表 2)。半活物寄生菌 (hemibiotroph) である *C. fioriniae* と異なり *B. oryzae* は necrotroph (殺生菌) であることを考えると (表 2)、*B. oryzae* が感染時に崩壊した細胞由来の植物因子を認識して -1,3-グルカン を細胞壁表層に蓄積し、膜構造が崩壊した細胞から放出される抗菌酵素等から菌体を保護することは菌の感染戦略上あり得るのではないかと思われる。

*C. fioriniae* と *B. oryzae* において、lutein と  $\beta$ -carotene への反応が異なったことから、これらの化合物の化学構造の違いを認識するセンサーがあることは十分考えられる。

今後、センサー遺伝子の特定と解析を行い、さらに感染プライミング因子に対する様々な感染様式の病原性糸状菌の応答とセンサー遺伝子の分布の相関などを解析することにより、病原性糸状菌が植物の何を認識して感染を決めているのかが明らかになると考えている。

#### <引用文献>

(1) Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. Fujikawa T, Kuga Y, Yano S, Yoshimi A, Tachiki T, Abe K, and Nishimura M. *Molecular Microbiology* 73: 553-570 (2009).

(2) Surface -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by preventing innate immunity in plants. Fujikawa T, Sakaguchi A, Nishizawa Y, Yusuke Kouzai, Minami E, Yano S, Koga H, Meshi T, and Nishimura M. *PLoS Pathogens* 8: e1002882 (2012).

(3) Levin, D.E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 2011, 189, 1145-1175.

#### 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 1件)

Otaka J., Seo S., and Nishimura M. (2016) Lutein, a Natural Carotenoid, Induces -1,3-glucan Accumulation on the Surface of the Cell Wall in Fungal Plant Pathogens. *Molecules* 21: 980. (査読あり)

[学会発表](計 4件)

大高潤之介、瀬尾茂美、西村麻里江. 植物病原性糸状菌の細胞壁構造変化を誘導する植物因子の同定. 平成 28 年度日本植物

病理学会大会.

2016.03.22 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

Nishimura M. Fungal plant pathogens organize cell wall components in response to plant factors. The 19<sup>th</sup> Fungal Genetics and Biology Conference of the Microbiological Society of Korea. 2016.02.23 Chungnam (Korea)

Nishimura M. Plant cues trigger cell wall reorganization in fungal plant pathogens. 11<sup>th</sup> US-Japan Scientific symposium Molecular Contact Points in Host-Pathogen Co-evolution.

2015.10.27 かがわ国際会議場 (香川市・香川県),

大高潤之介、瀬尾茂美、西村麻里江. 多犯性炭疽病菌 (*Colletotrichum fioriniae*) の感染プライミング因子の探索. 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス.

2014.11.15 東北大学仙台北キャンパス (宮城県・仙台市)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 麻里江 (NISHIMURA Marie)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域・上級研究員

研究者番号: 30370670

(2) 研究分担者

瀬尾 茂美 (SEO Shigemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域・主席研究員

研究者番号: 80414910

(3) 研究協力者

大高 潤之介 (OTAKA Jun-nosuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 植物・微生物機能利用研究領域・特別研究員