

令和元年5月30日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02433

研究課題名(和文) 感染植物アポプラストに分泌される植物-病原菌相互作用に関与するペプチド因子の同定

研究課題名(英文) Identification of proteins involved in plant-pathogen interactions by the proteome analysis of xylem saps from plants infected with *Fusarium oxysporum*

研究代表者

柘植 尚志 (TSUGE, Takashi)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：30192644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：土壌生息性糸状菌フザリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)には、それぞれ異なる作物に萎凋性病害を引き起こす100以上の病原性系統(分化型)が存在する。本菌は、宿主作物の根から侵入、導管内で蔓延、全身感染し、萎凋・枯死を引き起こす。したがって、感染植物導管液には、病原菌の病原性因子(エフェクター)と植物の抵抗性因子が分泌されていると予想される。本研究では、メロンまたはトマトに感染する分化型を接種したメロン植物とトマト植物から導管液を回収し、それらに含まれる分泌タンパク質を検出した。さらに、検出したタンパク質から、病原菌のエフェクター、植物の抗菌性タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フザリウム・オキシスポラム病原菌に対する有効な農薬は未だ開発されておらず、主な防除方法は抵抗性品種の利用と土壌消毒に限られている。本菌は、その被害の大きさと防除の困難さから、世界的に最重要病原菌のひとつに数えられており、その植物感染機構の解明は植物病理学分野の重要な研究課題である。本研究では、感染植物の導管液タンパク質の網羅的同定を研究基盤として、メロンまたはトマトに感染する分化型の新奇なエフェクターを同定するとともに、植物が導管液に分泌する新奇的な抗菌性タンパク質を同定した。得られた成果は、植物病原菌相互作用の新たな研究方法論に加え、重要病害の防除法を開発するための基盤情報を提供した。

研究成果の概要(英文)： *Fusarium oxysporum* is one of the most cosmopolitan fungal species in soil and includes more than 100 pathogenic variants, called forma specialis (f. sp.), that cause vascular wilts in a wide variety of crops by directly penetrating roots and colonizing the vascular tissue. The xylem saps from plants infected with *F. oxysporum* pathogens are expected to contain pathogen pathogenicity factors (effectors) and plant resistance factors. We collected xylem saps from melon and tomato plants infected with *F. oxysporum* f. sp. melonis and f. sp. lycopersici, respectively, and subjected the xylem saps to the proteome analysis using LC-MS/MS and MALDI-TOF/MS/MS. The analyses detected 417 and 233 proteins secreted by the f. sp. melonis and f. sp. lycopersici, respectively, and identified six novel effectors of the f. sp. melonis by gene disruption experiments. The proteome analyses of tomato xylem saps detected 1025 secreted proteins of tomato, and novel antifungal proteins were identified.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病害 植物病原糸状菌 病原性 抵抗性 導管液 プロテオーム解析 エフェクター 抗菌タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Fusarium oxysporum は、本来腐生的な土壌生息性糸状菌であるが、それぞれ異なる作物に萎凋性病害を引き起こす 100 以上の病原性系統が存在し、分化型と呼ばれている ()。本菌は、宿主作物の根から侵入、導管 (アポプラスト空間) 内で蔓延、全身感染し、萎凋・枯死を引き起こす (図 1)()。本菌に対する有効な防除薬剤は未だ開発されておらず、主な防除方法は抵抗性品種の利用と土壌消毒に限られている。本菌は、その被害の大きさと防除の困難さから、最重要病原菌のひとつに数えられており、その病原性機構の解明は植物病理学分野の重要な課題である。

研究開始当初、*F. oxysporum* 病原菌の植物寄生性に関与する 60 を超える遺伝子が同定され、さらに 8 つの分化型と非病原性菌株のゲノム情報が公開されていた。それらの情報に基づき、植物 - 微生物相互作用への関与が予想される 1,500 を超える分泌性の病原性関連因子 (エフェクタータンパク質) 候補が推定され、本菌の病原性研究は新たな局面を迎えていた ()。また、未同定の最重要ターゲットである分化型を決定する遺伝子の同定に向け、比較ゲノム解析によって分化型特異的なゲノム領域が同定されたが、特異的な領域は予想以上に大きく、多数の遺伝子がコードされている。不確定かつ莫大な候補遺伝子情報から目的遺伝子を拾い上げるためには、何らかの手段で候補遺伝子を絞り込む必要があった。本研究では、その手段として、*F. oxysporum* の感染現場である導管 (アポプラスト空間) に分泌されるタンパク質のプロテオーム解析を選択した。

アポプラストとは、植物体の内部で細胞膜の外側、すなわち細胞壁、細胞間隙、導管の総称である ()。アポプラストには、水と各種イオンに加え、細胞膜内部 (シンプラスト) から分泌される植物ホルモンをはじめとする機能物質が含まれ、それら物質と情報の近距離、さらに導管を経由した長距離移動によって個体全体が統御されている。またアポプラストは、侵入した病原菌と植物が対峙する場でもあり、病原菌の定着・増殖の成否はアポプラストでの攻防によって決まる。したがって、感染現場のアポプラストには、植物 - 微生物相互作用に関与する両者由来の種々の機能物質が分泌されている。近年の MALDI-TOF/MS/MS、LC-MS/MS などの分析機器の高性能化とゲノム情報の整備によって、生物サンプルからのタンパク質の網羅的同定が可能となり、*F. oxysporum* 感染植物の導管液は、病原菌のエフェクター、植物の抵抗性関連因子を探索するための理想的な材料と考えられた。

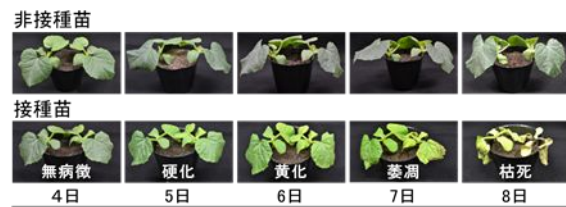


図1. メロンつる割病の発生圃場。

2. 研究の目的

先に研究代表者のグループは、メロンつる割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) とトマト萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) の GFP 発現株を用いて、それらの宿主植物、非宿主植物における感染行動を詳細に観察し、分化型の特異性が侵入段階、さらに侵入後も明確に維持されていることを確認した ()。本研究では、各病原菌が感染したメロン植物とトマト植物から導管液を回収し、それらのプロテオーム解析を研究基盤として、植物と病原菌が対峙するアポプラストに分泌される病原菌の新奇エフェクター、植物保護への応用展開も期待される植物の新奇抗菌タンパク質の同定を目指した。

一般にゲノムアノテーションでは、100 アミノ酸以上をコードする領域が読み枠 (ORF) として推定されている ()。近年、より低分子のタンパク質が重要な生物機能を持つことが多くの生物で発見され、植物 - 微生物相互作用に関与する低分子タンパク質も見出されている。そこで、植物の低分子タンパク質研究のパイオニアであり、この分野を牽引する九州工業大学の花田耕介との連携によって、公開データベースで網羅されていない、未同定の菌・植物両者の低分子タンパク質 (30~99 アミノ酸残基) もターゲットとした。また、生物サンプルのプロテオーム解析では、高性能な分析機器に加え、高度な技術と知識が求められる。本研究では、この分野のスペシャリストである名古屋大学 ITbM の桑田啓子がプロテオーム解析を担当した。



3. 研究の方法

(1) 導管液プロテオーム解析

本葉が展開し始めたメロン苗、トマト苗の根をメロンつる割病菌、トマト萎凋病菌の胞子懸濁液にそれぞれ浸漬した後、培養土に定植した。メロンでは接種 4、5、6 日後、病徴発現の遅いトマトでは接種 7、9、11、13 日



図2. メロンつる割病菌接種植物からの導管液の回収。

後に本葉の下部で胚軸を切断し、切断部から漏出する導管液を回収した(図2、3)。採取した導管液から無機物質を除去、凍結乾燥後、タンパク質をゲル内トリプシン消化し、LC-MS/MSまたはMALDI-Tof-MS/MSによって分画・検出した。参照データベースとして、メロンつる割病菌のゲノムアノテーションデータベースと99アミノ酸以下の低分子タンパク質データベース、トマト萎凋病菌のゲノムアノテーションデータベース、トマトのゲノムアノテーションデータベースと99アミノ酸以下の低分子タンパク質データベースを用いた。

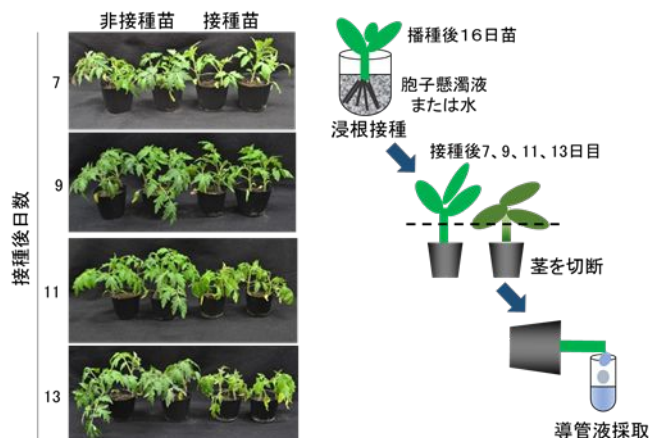


図3. トマト萎凋病菌接種植物からの導管液の回収。

(2) メロンつる割病菌感染根の RNA-Seq 解析

メロンつる割病菌接種後 4、6、8 日目の根から RNA を抽出し、HiSeq によって RNA-Seq データを得た。参照配列としてメロンつる割病菌 26406 株のゲノム配列を用いて、各遺伝子の発現量を FPKM 値として算出した。

(3) メロンつる割病菌のエフェクター遺伝子候補の病原性における機能解析

エフェクター候補遺伝子を ORF 上流、下流約 1.0 kb を含めてクローン化し、ORF を薬剤耐性マーカー遺伝子と組み換えた置換型遺伝子破壊ベクターを作成した。ベクター-DNA によって野生株を形質転換、遺伝子破壊株を選抜し、それらのメロンに対する病原性を検定した。

(4) トマトの導管液分泌性タンパク質の抗菌性検定

トマト導管液から検出された低分子タンパク質について、20 アミノ酸前後の部分ペプチドを合成し、4 種の植物病原系状菌 [トマト萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、アブラナ科植物炭疽病菌 (*Colletotrichum destructivum*) およびウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*)] に対する抗菌性を検定した。各菌の胞子を培地に懸濁し、ペプチドを添加 (最終濃度 1、10、100 μ M) して 1~2 日間培養し、菌糸生育の阻害を顕微鏡下で評価した。

4. 研究成果

(1) メロンつる割病菌の導管液分泌タンパク質の検出

メロンつる割病菌接種後 5、6、7 日目に回収した導管液のプロテオーム解析によって、4 個の低分子タンパク質を含む 417 個のつる割病菌タンパク質を検出した。植物病原菌が感染植物中で生産・分泌するタンパク質を同定した報告はあるが、これほど多数の菌由来タンパク質を同定した例はない。これまでに植物病原系状菌から同定されたエフェクターの特徴として、低分子、細胞外分泌性、機能未同定などが報告されている。そこで、同定した 417 個のタンパク質について、推定機能、サイズ、推定細胞内局在性、他の分化型や他種菌における分布などの特徴を整理し、カタログ化した。417 個のタンパク質のうち、204 個は機能未知であったが、先にエフェクター候補として同定されている Six6、LysM、NPP1 などの相同タンパク質、各種細胞壁分解酵素も見出され、本研究のプロテオーム解析の有効性が示された(図4)。また、250 アミノ酸以下のタンパク質が 51 個見出され、さらに、糸状菌のエフェクター候補を推定する EffectorP プログラム() によって、34 個の候補タンパク質が同定された。

エフェクター候補をさらに選抜するために、つる割病菌接種後 4、6、8 日目の根の RNA-Seq 解析を行い、そのデータから 417 個の導管液分泌タンパク質をコードする遺伝子の発現情報を抽出した。その結果、つる割病菌のアクチン遺伝子よりも高発現する 54 個が見いだされた(図5)。

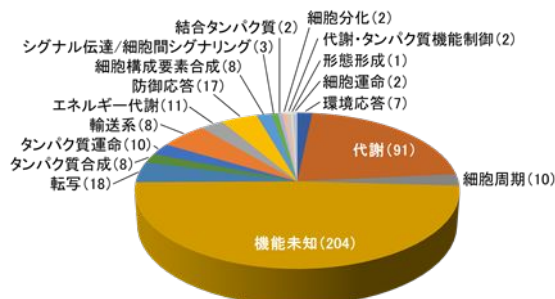


図4. メロンつる割病菌の導管液分泌タンパク質の機能分類

(2) メロンつる割病菌の導管液分泌性エフェクター遺伝子の同定

導管液分泌性タンパク質の性質、感染時の発現パターンに基づき、21 個のエフェクター遺伝子候補を選抜し、これら遺伝子の破壊株を作出した。その結果、21 個の候補遺伝子のうち 12 個がゲノム中に複数コピーを存在し、1 コピー破壊株は野生株とほぼ同様な病原性を示した。

そこで、それらのうち 5 遺伝子について、2 または 3 コピー破壊株を作出したところ、病原力が低下すること、すなわちこれら遺伝子が病原力に関与することが明らかとなった。残りの 7 遺伝子も有力なエフェクター候補であることから、遺伝子重複がエフェクター遺伝子の共通した特徴であることが強く示唆された。

一方、21 個の候補遺伝子のうち残りの 9 個はシングルコピー遺伝子であり、破壊株の病原性検定によって、1 遺伝子 (*PSP1* と命名) が病原性に関与することが明らかとなった (図 6)。また、同定した 6 個の病原性関連遺伝子のうち 4 個が、先担当研究グループで同定した病原性に不可欠な転写制御因子 *Fow2* によって制御されることを見出した。さらに、ベンサミアナタバコ葉へのアグロインフィルトレーション実験によって、同定したエフェクターが毒性やエリシター活性を持たないことを示唆する結果を得た。

以上の結果から、メロンつる割病菌の導管液分泌タンパク質のプロテオーム解析は、本菌の病原性関連遺伝子の同定に有効な方法であることが示された。

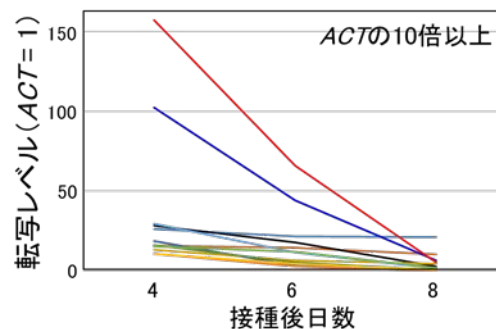


図5. メロンつる割病菌の根への感染時に高発現する遺伝子、つる割病菌のアクチン遺伝子の転写レベルに対する相対値。

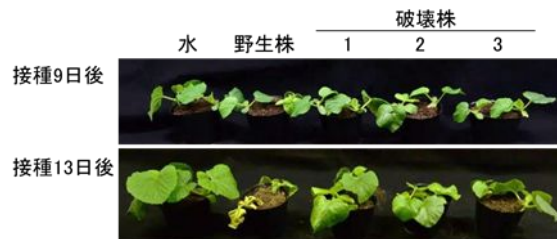


図6. メロンつる割病菌の *PSP1* 破壊株の病原性。

(3) トマト萎凋病菌の導管液分泌タンパク質の検出

トマト萎凋病菌接種後 7、9、11、13 日目に回収した導管液のプロテオーム解析によって、233 個の萎凋病菌タンパク質を検出した。メロンつる割病菌と同様に、これらタンパク質の特徴をカタログ化するとともに、メロンつる割病菌の導管液分泌タンパク質と比較した。その結果、両菌に共通な 48 個のタンパク質が検出された。さらに、これらタンパク質について、導管液における接種後の経時的な相対量変化を算出することによって、感染時に高発現する 20 個の遺伝子を見出した。これら遺伝子には、メロンつる割病菌のエフェクター候補として選抜した 4 遺伝子も含まれており、これらが *F. oxysporum* 病原菌に共通な病原性関連遺伝子であることが強く示唆された。さらに、トマト萎凋病菌からのみ検出された導管液分泌性タンパク質から、病原性に関与する可能性が高いと考えられる 12 個を選抜した。これらタンパク質は、どれも導管液中の相対量が比較的多い低分子タンパク質であり、有望なエフェクター候補であることが示唆された。

(4) トマト萎凋病菌接種苗および非接種苗の導管液からのトマトタンパク質の検出

トマト萎凋病菌の接種苗と非接種苗から 7、9、11、13 日後に回収した導管液のプロテオーム解析によって、合計 1025 個 (うち 30 個は低分子タンパク質) のトマトタンパク質を検出した。萎凋病菌接種・非接種および接種後日数によるトマトタンパク質の質的・量的変化、接種植物からのみ検出された 194 個のトマトタンパク質の量的変化、推定細胞内局在性、推定機能などを整理しカタログ化した。導管液から検出されたトマトタンパク質には、非接種植物または接種植物からのみ検出されたタンパク質が多数含まれ、また接種植物では継時的にタンパク質組成が変化することから、萎凋病菌の感染、増殖の段階ごとにトマトの遺伝子発現が変化することが示唆された。接種トマトの導管液からのみ検出された 194 個のトマトタンパク質について、STRING プログラムを用いて機能を推定したところ、抵抗性反応時の情報伝達に関与する酵素、糸状菌の菌糸分解に関与する酵素などが多数見出された。27 個のタンパク質結合タンパク質も検出され、病原菌エフェクターとの相互作用因子が含まれる可能性も考えられた。

(5) トマトの導管液分泌性抗菌タンパク質の探索

検出した 30 個の低分子タンパク質は、既知の抗菌タンパク質デフェンシンとは相同性が認められなかった。これらのうち 14 個について、部分配列 (11 ~ 24 アミノ酸残基) の合成ペプチドを合成し、4 種の植物病原糸状菌に対する抗菌活性を検定した。その結果、*F. oxysporum*、*B. cinerea*、*C. destructivum*、*C. orbiculare* に抗菌活性を示すそれぞれ 10 個、

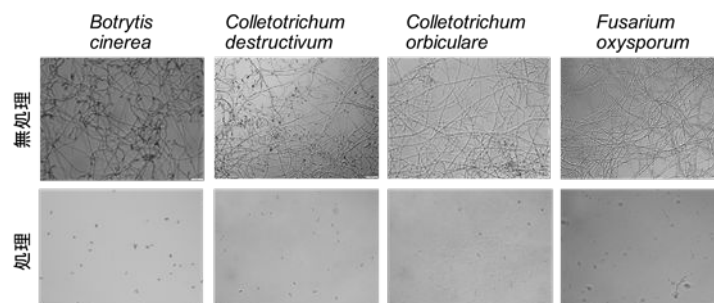


図7. トマトペプチドの抗菌活性。培地に胞子を懸濁し、ペプチドを添加 (100 μ M)、24時間培養。

15 個、20 個、16 個のペプチドが見出された。なお、4 種の糸状菌すべてに抗菌性を示すペプチド(図 7)から特定の菌種にのみ抗菌性を示すペプチドまで、抗菌スペクトルは多様であった。また、抗菌活性を示すペプチドの多くが高い等電点を持つことが見出され、細胞膜をターゲットとすることが示唆された。そこで、4 種の糸状菌すべてに抗菌活性を示したペプチドについて、ペプチド処理後、細胞膜脱分極の指示薬 bis-(1,3-dibutylbarbituric acid-trimethine oxonol (DiBAC₄(3)) によって染色したところ、菌糸の強い染色が認められ、これらペプチドが菌の細胞膜脱分極を引き起こすことが明らかとなった。

シロイヌナズナの 201 個の低分子タンパク質由来の 616 個の部分合成ペプチドについても抗菌活性を検定した。その結果、*F. oxysporum*、*B. cinerea*、*C. destructivum*、*C. orbiculare* に抗菌活性を示すそれぞれ 36 個、187 個、375 個、227 個のペプチドが見出され、トマトペプチドと同様に、抗菌スペクトルは多様であった。さらに、胞子の発芽阻害、発芽管伸長阻害だけでなく、菌糸の形態異常を引き起こすペプチドも見いだされた(図 8)。

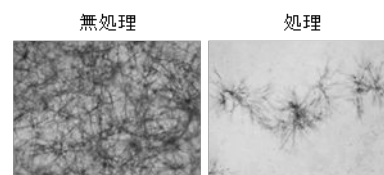


図8. *F. oxysporum*の菌糸の分枝異常を引き起こすトマトペプチド。

(6) 導管液に含まれる糖とアミノ酸の定量

メロンつる割病菌接種メロン根の RNA-Seq 解析によって、感染時に本菌の糖新生やアミノ酸合成遺伝子が高発現することを見出した。導管液中の糖とアミノ酸を LC-MS 解析によって網羅的に検出・定量したところ、導管液が貧栄養条件であることが確認された。この結果は、本菌が導管内でエフェクターを発現・分泌し、定着・増殖するためには、基礎代謝が重要であることを示した。

<引用文献>

- 駒田旦, 小川奎, 青木孝之編 (2011) フザリウム —分類と生態・防除—. 全国農村教育協会.
 Ma L-J *et al.* (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*. 464, 367-373.
 桜井直樹 (1997) 植物のアポプラストとその機能. *化学と生物* 35, 581-588.
 Imazaki I *et al.* (2007) Fow2, a Zn(II)2Cys6-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 63, 737-753.
 Hanada K *et al.* (2013) Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 2395-2400.
 Giraldo, M.C. and Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 800-814.
 Andrews, S.J. and Joseph, A.R. (2014). Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nat. Rev. Genet.* 15, 3, 193-204
 Sperschneider J *et al.* (2015) EFFECTORP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.13794.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- 武田智之, 花田耕介 (2019) シロイヌナズナでの短い遺伝子に特化したトランスクリプトームデータベースおよび過剰発現植物ライブラリーを利用した機能探索. *植物の成長調節* (印刷中) 査読無
 Nakaminami K, Okamoto M, Higuchi-Takeuchi M, Yoshizumi T, Yamaguchi Y, Fukao Y, Shimizu M, Ohashi C, Tanaka M, Matsui M, Shinozaki K, Seki M, Hanada K (2018) AtPep3 is a hormone-like peptide that plays a role in the salinity stress tolerance of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 5810-5815. (doi.org/10.1073/pnas.1719491115) 査読有

[学会発表](計 14 件)

- 范環, 松本敏幸, 大空岳, 桑田啓子, 森仁志, 花田耕介, 柘植尚志 (2019) 感染植物導管液に分泌されるメロンつる割病菌のエフェクターの同定. 日本植物病理学会大会
Hanada K (2019) Small coding genes hidden in plant genomes, encode multiple hormone-like peptides. Japan-Taiwan Plant Biology 2019 (招待講演)
 矢野俊通, 金有王, 武田智之, 大林祝, 花田耕介 (2018) シロイヌナズナのペプチドライブラリーを利用した新規ホルモン様ペプチドの探索. 第10回中国地域育種談話会
 西村勇汰, 鳥居怜平, 近藤隆之, 樋口美栄子, 嶋田知生, 深尾陽一朗, 岡本昌憲, 清水みなみ, 吉積毅, 中南健太郎, 仁志蘭子, 関原明, 篠崎一雄, 松井南, 多田安臣, 野元美佳, 柘植尚志, 花田耕介 (2018) 防御強化を誘導するホルモン様ペプチドのシグナル伝達経路. 第10回中国地域育種談話会
Hanada K (2018) Small coding genes hidden in plant genomes, encode hormone-like

peptides. International Conference on Molecular Biology and Bioinformatics (ICMBB 2018) (招待講演)

花田耕介 (2018) 植物ホルモンのシグナル伝達を阻害するペプチド性遺伝子の機能解析 .形質転換植物デザイン研究拠点研究セミナー (招待講演)

花田耕介 (2017) モデル植物のシロイヌナズナに存在する生理活性ペプチドの網羅的探索 第 41 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム (招待講演)

垣田満, 伊藤佳世子, 大村孝幸, 小谷政弘, 内藤康秀, 桑田啓子 (2017) 新規イオン化法 DIUTHAME による精密質量測定およびイメージング質量分析 .日本質量分析学会第 65 回質量分析総合討論会

桑田啓子, 伊藤佳世子, 大村孝幸, 小谷政弘, 内藤康秀 (2017) 新規イオン化法 DIUTHAME による MALDI-TOFMS 測定 . 日本質量分析学会第 65 回質量分析総合討論会

范 環, 松本敏幸, 大空 岳, 桑田啓子, 森 仁志, 花田耕介, 柘植尚志 (2017) 感染植物のプロテオーム・トランスクリプトーム解析によるメロンつる割病菌の病原性関連遺伝子の同定 . 日本植物病理学会大会

大空岳, 安藤佑以, 桑田啓子, 森仁志, 花田耕介, 柘植尚志 (2016) 感染植物の導管液プロテオーム解析によるメロンつる割病菌の病原性関連遺伝子の同定 . 日本植物病理学会大会

松本敏幸, 村瀬良太, 大空岳, 飯田祐一郎, 桑田啓子, 花田耕介, 柘植尚志 (2016) メロンつる割病菌の転写制御因子 Fow2 によって制御される病原性関連遺伝子の探索 .日本植物病理学会大会

花田耕介 (2015) 網羅的な植物ゲノム解析から生理活性シグナル遺伝子の探索 .新生命科学分野開拓とスーパーコンピュータ「京」

Hanada K (2015) Peptides encoded by small genes hidden in plant genomes show essential functions. 3rd European Workshop on Peptide Signaling and Activity in Plants (招待講演)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：花田 耕介

ローマ字氏名：(HANADA, Kosuke)

所属研究機関名：九州工業大学

部局名：大学院情報工学研究院

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 50462718

研究分担者氏名：望田 啓子 (桑田 啓子)

ローマ字氏名：(MOCHIDA, Keiko (KUWATA, Keiko))

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：トランスフォーマティブ生命分子研究所

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁): 70624352

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。