

平成30年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04457

研究課題名(和文) 糸状菌エフェクターNIS1の植物免疫抑制機能に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the function of the fungal effector NIS1 for suppression of plant immunity

研究代表者

高野 義孝 (Takano, Yoshitaka)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：80293918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原糸状菌はエフェクターと呼ばれる一群の分泌タンパク質を用いて、宿主植物の防御機構を攪乱し、感染を成立させる。本研究ではウリ科作物に病害を引き起こすウリ類炭疽病菌において同定されたエフェクターNIS1に焦点をあてた。植物は病原糸状菌における特異的な分子パターン(PAMPs)を認識し、抵抗反応を誘導する。研究の結果、病原糸状菌において広く保存されているNIS1は、このPAMPsによって誘導される抵抗性に必要なタンパク質リン酸化酵素を標的とすること、本エフェクター機能は炭疽病菌などの感染戦略において重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant pathogenic fungi establish the infection of their host plants by using a set of secreted proteins called effectors. This study focused on the effector NIS1 identified in a cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*. Plants activate defense responses via the recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). The study revealed that NIS1, widely conserved in plant pathogenic fungi, targets protein kinases critical for the PAMP-triggered immunity and plays important roles for infection strategies of plant pathogenic fungi including *Colletotrichum* species.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原糸状菌 エフェクター 抵抗性 PAMPs タンパク質リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

植物の病気の7割以上は糸状菌によって引き起こされている。したがって、植物病原糸状菌の感染戦略を解明し、その知見を基盤として、より有効な防除技術を開発することは作物保護における重要課題の一つである。植物はキチンなどの糸状菌のPAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) を認識し防御応答を活性化するが、このような防御応答はPAMP誘導型免疫と呼ばれる。一方、植物病原糸状菌は、エフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌し、このPAMP誘導型免疫を抑制する。植物病原糸状菌のゲノムには、数百の機能未知の分泌タンパク質遺伝子が存在しており、これらはエフェクター候補として捉えることができる。このことより、植物病原糸状菌は多数のエフェクター分子群を駆使することにより植物を制圧していると推定できる。

しかしながら、具体的な機能が明らかになっている糸状菌エフェクターの例はまだ限られているのが現状である。申請者は炭疽病菌 (*Colletotrichum* 属菌) を主な研究対象として植物病原糸状菌のエフェクターを研究しており、その研究の一つとして、アグロバクテリウムを利用した植物における一過的なタンパク質発現系を用い、ベンサミアナタバコに過敏感様細胞死を誘導する病原菌因子をスクリーニングした。その結果として、過敏感様細胞死を誘導するウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) の分泌タンパク質を発見し、本分子をNIS1 (Necrosis Inducing Secreted protein 1) と命名した。NIS1は特徴的なドメインを有さない比較的小さなタンパク質であり、本菌のエフェクターの一つであることが示唆された。また、NIS1は植物病原糸状菌において広く保存されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、同定したNIS1のエフェクター機能の詳細を明らかにすることである。すでにNIS1は、植物免疫反応の一つである疫病菌のPAMPである分泌タンパク質INF1が誘導する過敏感細胞死反応を抑制すること、また、シロイヌナズナのPAMP誘導型免疫に関わる因子であるBAK1 (Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1) と相互作用することを見出していた。本研究では、具体的には、(1) NIS1のBAK1への結合が、BAK1にどのような影響を与えるのか、(2) NIS1はINF1による過敏感細胞死以外の植物免疫反応を抑制できるのか、(3) NIS1はBAK1以外の植物因子も標的としているのか、(4) NIS1が標的とする植物因子は炭

疽病菌を含む植物病原糸状菌への抵抗性に実際に貢献しているのか、という問題に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、NIS1のエフェクター機能の解明を目指したが、その研究方針・方法は以下の通りである。

(1) NIS1のBAK1への結合とその機能阻害

NIS1存在下でのBAK1タンパク質の状態を調べるために、両タンパク質をベンサミアナタバコにおいて一過的に発現させた。それぞれのタンパク質遺伝子をT-DNA領域内に組み込んだバイナリーベクターを有するアグロバクテリウムをベンサミアナタバコに注入接種した。アグロバクテリウムを接種した植物サンプルについて、トータルタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析をおこない、それぞれのタンパク質を検出した。BAK1のリン酸化能への影響については、*in vitro*での自己リン酸化アッセイによって調査した。NIS1タンパク質はタバコ培養細胞を用いて作成し、BAK1タンパク質は大腸菌を用いて作成した。共免疫沈降実験については、上述と同様にアグロバクテリウムを用いて当該タンパク質を一過的に発現させ、そのサンプルを実験に用いた。

(2) NIS1による他の免疫反応の抑制

活性酸素生成実験については、ルミノールを用いた化学発光測定法を用いた。試験するベンサミアナタバコ様のリーフディスクを作成し、PAMPであるf1g22を処理したのち、ルミノールを加え、発光を測定した。

(3) BAK1以外の標的因子の探索

活性酸素生成への抑制能に関する実験結果に基づき、BIK1 (BOTRYTIS-INDUCED KINASE1) をNIS1の新たな標的候補として解析した。NIS1とBIK1間の相互作用については、上述と同じく、ベンサミアナタバコにおいて一過的に当該タンパク質を発現させ、共免疫沈降実験を実施して調査した。

(4) 炭疽病菌の感染戦略におけるNIS1の重要性

ベンサミアナタバコにおいてNIS1が炭疽病菌への抵抗性を抑制するかを調べるために、MoNIS1を一過的に発現させた後に、ウリ類炭疽病菌を接種し、イネいもち病菌のNIS1ホモログであるMoNIS1の発現の影響を評価した (ウリ類炭疽病菌のNIS1は細胞死を起こすので、細胞死誘導活性がないMoNIS1を使用している)。具体的には、接種葉における壊死斑の数を定量化し評価した。一方、シロイヌナズナにおけるNIS1の重要性の評価については、NIS1が標的とするBAK1やBIK1が欠損した変異体に、不適応型炭疽病菌であるクワ炭疽病菌を接種することでおこなった。

各シロイヌナズナラインにおいてクワ炭疽病菌の侵入菌糸の形成率を測定し評価した。

4. 研究成果

(1) NIS1 による BAK1 の機能阻害

NIS1 と BAK1 の結合によって、BAK1 の機能が阻害されるかを調査した。まず、NIS1 の存在下で BAK1 の蓄積量に変化はなく、NIS1 が BAK1 を分解する可能性、あるいは逆に安定化している可能性は低いと推察された。BAK1 は細胞膜上に存在する受容体様キナーゼである。そこで、NIS1 の結合によって、BAK1 のキナーゼ活性(リン酸化能)が阻害されるかを調査した。in vitro リン酸化アッセイによって調査した結果、NIS1 は BAK1 の自己リン酸化を明確に阻害することが判明した。さらに酵母ツーハイブリット解析により、NIS1 が、BAK1 の細胞質領域に結合することを見出した。この部分の大半はキナーゼドメインであり、このことはNIS1 が BAK1 の自己リン酸化を阻害した結果をさらに支持した。

また、NIS1 側についてはカルボキシル末端の 30 アミノ酸を削っても BAK1 との結合能は保持されている一方、60 アミノ酸を削った場合、その結合能は消失することを明らかにした。このことより、NIS1 のカルボキシル末端 60 アミノ酸がその結合に必要であることが示唆された。重要なポイントとして、カルボキシル末端の 30 アミノ酸の欠失変異体は INF1 による過敏感細胞死を抑制した一方、60 アミノ酸欠失変異体は、その抑制能を消失しており、NIS1 の BAK1 への結合能と INF1 誘導細胞死への抑制能との間に相関性が見出された。

さらに、他の植物におけるシロイヌナズナ BAK1 オルソログに対する NIS1 の結合能を調査した。まず、ベンサミアナタバコの NbSERK3 について調査した。ベンサミアナタバコに異なるエピトープタグが付加された NIS1 および NbSERK3 を一過的に発現させ、共免疫沈降実験をおこない、その相互作用を調査した。その結果、NIS1 は NbSERK3 と共精製され、両者の相互作用が強く示唆された。さらにイネのオルソログ OsBAK1 についても同様の実験を実施し、OsBAK1 と NIS1 の相互作用を確認した。

(2) NIS1 は f1g22 による活性酸素の生成を抑制する

INF1 が誘導する過敏感細胞死以外の植物免疫反応を NIS1 が抑制できるのかを調べるために、細菌の PAMP である f1g22 処理によってベンサミアナタバコにおいて誘導される活性酸素生成に NIS1 が影響を与えるかを調査した。その結果、NIS1 の存在下において、f1g22 依存的な活性酸素の生成は顕著に阻害され、NIS1 が INF1 による過敏感細胞死以外の免疫反応を抑制することが明らかとなった。さらにアブラナ科炭疽病菌およびイネい

もち病菌の NIS1 ホモログが、ウリ類炭疽病菌の NIS1 と同様に f1g22 が誘導する活性酸素生成を抑制することを明らかにし、NIS1 のエフェクター機能の保存性が強く示唆された。

(3) NIS1 は BIK1 を標的とする

シロイヌナズナにおける f1g22 依存的な活性酸素の生成においては、NADPH 酸化酵素である RbohD が必須の役割を果たしている。この RbohD は BIK1 にリン酸化されることにより、活性化することが近年になり明らかにされている。NIS1 が f1g22 による活性酸素生成を抑制した結果より、BAK1 と同様のキナーゼドメインを有する BIK1 を NIS1 が標的とする可能性が示された。そこで、NIS1 と BIK1 の相互作用の有無を検討した。その結果、NIS1 は BAK1 に加えて、BIK1 とも相互作用することを明らかにした。さらに、NIS1 による BIK1 のリン酸化能への干渉について、BIK1 の自己リン酸化アッセイにより調査した。その結果、NIS1 の存在下において、BIK1 の自己リン酸化能は顕著に低下し、NIS1 が BIK1 のリン酸化能を阻害することが強く示唆された。さらに NIS1 による BIK1 と RbohD の相互作用への干渉について調査した。具体的には、これら 3 種の当該タンパク質をベンサミアナタバコにおいて一過的に発現させ、共免疫沈降実験を実施した。その結果、NIS1 存在下において、BIK1 と RbohD の相互作用は阻害されることを発見した。

(4) 植物病原糸状菌の感染戦略における NIS1 の重要性

NIS1 が BAK1 および BIK1 を標的としていることを示す結果をうけ、シロイヌナズナの BAK1 あるいは BIK1 の変異が、炭疽病菌への抵抗性に影響をあたえるかを調査した。その結果、BAK1 および BIK1 がシロイヌナズナのクワ炭疽病菌への抵抗性に関与することが判明した。さらに MoNIS1 を発現させたベンサミアナタバコにおいて、ウリ類炭疽病菌への感受性が増大することも明らかにした。これらの結果より、NIS1 のエフェクター機能が炭疽病菌の病原性に貢献していることが強く示唆された。

一方で、イネいもち病菌の場合は、NIS1 のホモログ遺伝子 (MoNIS1) の標的破壊株は、イネ、オオムギに対する病原性を顕著に低下させることを見出しており、これらの結果より、植物病原糸状菌において広く保存されているエフェクターNIS1 は、PAMP 誘導免疫機構の中核分子を標的とすることで、炭疽病菌、イネいもち病菌などの様々な植物病原糸状菌の病原性発現に貢献していることが推察された。また、植物病原糸状菌の NIS1 ホモログ間における詳細な系統解析の結果、イネいもち病菌が現有する NIS1 ホモログ遺伝子 (MoNIS1) は、担子菌からの水平移動によって獲得された可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- ① Piślewska-Bednarek M, Nakano RT, Hiruma K, Pastorczyk M, Sánchez-Vallet A, Singkaravanit-Ogawa S, Ciesiolka D, Takano Y, Molina A, Schulze-Lefert P, and Bednarek P. Glutathione transferase U13 functions in pathogen-triggered glucosinolate metabolism. (2018) *Plant Physiology*, 査読有, 176:538-551. DOI: 10.1104/pp.17.01455.
- ② Ahmad Azmi NS, Singkaravanit-Ogawa S, Ikeda K, Kitakura S, Inoue Y, Narusaka Y, Shirasu K, Kaido M, Mise K, and Takano Y. Inappropriate expression of an NLP effector in *Colletotrichum orbiculare* impairs infection on Cucurbitaceae cultivars via plant recognition of the C-terminal region. (2018) *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 査読有, 31:101-111. DOI: 10.1094/MPMI-04-17-0085-FI.
- ③ Fukunaga S, Sogame M., Hata M, Singkaravanit-Ogawa, S, Piślewska-Bednarek M, Onozawa-Komori M, Nishiuchi T, Hiruma K, Saitoh H, Terauchi R, Kitakura S, Inoue Y, Bednarek P, Schulze-Lefert P, and Takano Y. Dysfunction of Arabidopsis MACPF domain protein activates programmed cell death via tryptophan metabolism in MAMP-triggered immunity. (2017) *Plant Journal*, 査読有, 89:381-393. DOI: 10.1111/tpj.13391.
- ④ Yamada K, Saijo Y, Nakagami H, and Takano Y. Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in Arabidopsis. (2016) *Science*, 査読有, 354:1427-1430. DOI: 10.1126/science.aah5692.
- ⑤ Irieda H, Ogawa S, and Takano Y. Focal effector accumulation in a biotrophic interface at the primary invasion sites of *Colletotrichum orbiculare* in multiple susceptible plants. (2016) *Plant Signaling & Behavior*, 査読有,

11:e1137407. DOI:10.1080/15592324.2015.1137407

- ⑥ Irieda H, and Takano Y. Identification and characterization of virulence-related effectors in the cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*. (2016) *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 査読有, 95: 87-92. DOI: 10.1016/j.pmp.2016.01.006
- ⑦ Gan P, Narusaka M, Kumakura N, Tsushima A, Takano Y, Narusaka Y, and Shirasu K. Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles. (2016) *Genome Biology and Evolution*, 査読有, 8:1467-1481. DOI: 10.1093/gbe/evw089
- ⑧ 山田晃嗣, 高野義孝 植物の防御機構の新しい一面:糖トランスポーター制御による細胞外の糖含量コントロール (2017) *実験医学* 査読無, 35: 974-977.
<https://www.yodosha.co.jp/jikkeniku/book/9784758101622/index.html>

〔学会発表〕(計15件)

- ① 井上 喜博, Pamela Gan, 鳴坂 義弘, 白須 賢, 高野 義孝, 比較ゲノム・トランスクリプトーム解析によるウリ類炭疽病菌の強病原性関連因子の探索, 平成30年度日本植物病理学会大会, 2018年.
- ② 小川泰生, 井上喜博, Pamela Gan, 海道真典, 三瀬和之, 鳴坂 義弘, 白須 賢, 高野義孝, ウリ類炭疽病菌の宿主特異性に関する研究:アルファルファ炭疽病菌との比較解析, 平成30年度日本植物病理学会大会, 2018年.
- ③ 田中冬樹, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, 海道真典, 三瀬和之, 高野義孝, ウリ類炭疽病菌は転写制御因子 SGE1 依存的にメロン根部へ感染し植物体の萎凋症状を引き起こす, 平成30年度日本植物病理学会大会, 2018年.
- ④ 高野義孝, 植物と炭疽病菌の攻防戦, 第10回植物ストレス科学研究シンポジウム, 2018年.

- ⑤ 高野義孝, 炭疽病菌と植物の相互作用 : エフェクター研究を中心に, 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017 年.
- ⑥ Kosaka A, Bednarek P, Ishikawa A, Kaido M, Mise K, and Takano Y. : Involvement of tryptophan-derived secondary metabolism in post-invasive resistance of *Arabidopsis thaliana* against fungal pathogens. 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017 年.
- ⑦ Singkaravanit-Ogawa S, Nur Sabrina AA, Ikeda K, Tanaka S, Inoue Y, Kaido M, Mise K, Narusaka Y, Shirasu K, and Takano Y. : Inappropriate expression of NLP effector impairs *Colletotrichum* infection on cucurbits via recognition of its C-terminal region, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017 年.
- ⑧ Nur Sabrina AA, Singkaravanit-Ogawa S, Ikeda K, Kaido M, Mise K, and Takano Y. Inappropriate expression of the NLP effector impairs the infection of *Colletotrichum orbiculare* on cucumber, 平成 28 年度日本植物病理学会関西部会, 2016 年.
- ⑨ 井上喜博, Pamela Gan, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝, ウリ類炭疽病菌の強病原性株 RSC0-09-1-2 の強病原性因子の探索, 平成 28 年度日本植物病理学会関西部会, 2016 年.
- ⑩ 入枝泰樹, 森正之, 山田晃嗣, 押川友, 大木進野, 齋藤宏昌, 寺内良平, 高野義孝, 糸状菌エフェクターNIS1 は高等植物の PRR 複合体における複数の因子を攻撃する, 平成 28 年度日本植物病理学会大会, 2016 年.
- ⑪ 井上喜博, Pamela Gan, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝, ウリ類炭疽病菌の強病原性株 RSC0-09-1-2 に関する研究, 平成 28 年度日本植物病理学会大会, 2016 年.
- ⑫ 奥田竜太, 石塚隼也, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, 山田晃嗣, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝, ウリ類炭疽病菌の付着器において発現するエフェクター候補群 ECAP の機能解析, 平成 28 年度日本植物病理学会大会,

2016 年.

- ⑬ 熊倉直祐, パメラ・ガン, 津島綾子, 浅井秀太, 門田康弘, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 高野義孝, 白須賢, 比較ゲノム解析を用いた *Colletotrichum* 属菌における病原性エフェクターの探索, 平成 28 年度日本植物病理学会大会, 2016 年.
- ⑭ 津島綾子, 鳴坂真理, Pamela Gan, 熊倉直祐, 浅井秀太, 門田康弘, 高野義孝, 鳴坂義弘, 白須賢, コアエフェクター候補遺伝子 CCE1 は *Colletotrichum* 属菌に保存され、細胞死を誘導する, 平成 28 年度日本植物病理学会大会, 2016 年.
- ⑮ Effectors in *Colletotrichum orbiculare*. Takano Y. 11 th US-Japan Scientific Seminar, 2015.

[図書] (計 1 件)

- ① 高野義孝, 感染制御型農薬の可能性～エフェクター分泌阻害剤の開発研究を例に～, (2018) 農薬の創製研究の動向 - 安全で環境に優しい農薬開発の展開 - (監修 梅津憲治) 222-227. シーエムシー出版

[その他]

ホームページ

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

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・教授
研究者番号 : 80293918

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

西内 巧 (NISHIUCHI TAKUMI)
金沢大学・学際科学実験センター・准教授
研究者番号 : 20334790

(4) 研究協力者

無し