

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：19KK0397

研究課題名（和文）ケミカルバイオロジーを用いた植物病原糸状菌のEV分泌機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the extracellular vesicle secretion mechanism of a plant pathogenic fungus using chemical biology

研究代表者

熊倉 直祐（Kumakura, Naoyoshi）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：50815438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,300,000円

渡航期間： 3ヶ月

研究成果の概要（和文）：Richard O'Connell博士との共同研究により、大きく3つの結果が得られた。まず第一に、申請者が基課題で同定したエフェクター分泌阻害効果を持つ化合物の作用標的が、EV分泌機構ではない可能性が示唆された。第二に、植物病原糸状菌であるアブラナ科炭疽病菌において新技術を確立し、国際共著論文として国際誌への発表に至った。第三に、上記の技術を用い、炭疽病菌の病原性に寄与する重要な因子の機能解明が可能となり、その成果を2024年度中に国際共著論文として投稿予定である。また、その成果の一部は特許申請予定である。以上のように、本支援は複数の原著論文、特許申請、及び継続した共同研究体制として結実した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原糸状菌は、多大な作物被害を引き起こすため、その病原性メカニズムを理解することは食糧の安全保障上、重要である。この研究では、植物病原糸状菌の病原性メカニズムを解明するためのゲノム編集技術と解析技術の開発が実現した。これらの成果は、炭疽病菌の病原性メカニズムの理解に貢献し、実際に申請者の三報の筆頭著者論文として結実し、2024年度中にさらに一報を報告する予定である。これらの結果は、病原性メカニズムの理解とそれを利用した植物病原糸状菌による作物被害の技術開発への寄与が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Through collaborative research with Dr. Richard O'Connell, three significant outcomes were achieved. Firstly, it was suggested that the target of compounds identified by the applicant in their basic project, which possess effector secretion inhibition effects, may not be the EV secretion mechanism. Secondly, new technology was established in the Brassicaceae anthracnose fungus, a plant pathogenic filamentous fungus, leading to publication in an international journal as a co-authored paper. Thirdly, using the aforementioned technology, it became possible to elucidate the functions of key factors contributing to the pathogenicity of the anthracnose fungus. These results are scheduled for submission as an international co-authored paper by 2024, with some of the findings planned for patent application. Thus, this support has borne fruit in the form of multiple original papers, patent applications, and ongoing collaborative research efforts.

研究分野：植物病理学、植物病原糸状菌、ゲノム編集、病原性

キーワード：炭疽病菌 ゲノム編集 付着器 マーカーリサイクリング 病原性因子

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

植物病原糸状菌はエフェクターと呼ばれる小分子分泌性タンパク質を駆使することで感染を成立させる。近年、これらエフェクターが Extracellular vesicle (EV) を介し分泌される可能性が示唆された。EV は細胞が分泌する膜小胞であり、シグナル分子を運搬することで細胞間コミュニケーションを担うが、EV 分泌に寄与するメカニズムは不明な点が多い。申請者は研究開始時まで、植物病原糸状菌の一種である炭疽病菌を対象にエフェクター分泌を阻害する複数の化合物を同定した。申請者が基課題においてこれらのエフェクター分泌阻害剤の中に、EV 分泌を標的にするものが含まれる可能性があった。しかしながら、EV を可視化し、定量する手法がなく、エフェクター分泌阻害剤の EV 分泌への影響を評価する事ができなかった。

そのような折、フランス国立農業・食糧・環境研究所 (INRAE) でグループリーダーを務める Richard O'Connell 博士が炭疽病菌において EV 分泌の可視化・定量方法を、当時未発表ながら開発していた。申請者は国際学会での Richard O'Connell 博士との議論で、当時未発表ながら同氏が EV のマーカー遺伝子を同定し、その定量方法を確立したことを知った。また同氏は炭疽病菌について長年の研究実績を持つ研究者であり、アブラナ科炭疽病菌についての高効率な形質転換法、細胞生物学的な解析手法など、炭疽病菌研究の展開上、有用な技術・知見を有しており、基課題の共同研究・および技術交流のホストとして、最適な相手と判断できた。

## 2. 研究の目的

本課題では Richard O'Connell 博士との共同研究により、申請者が持つエフェクター分泌阻害剤の中から EV の分泌を阻害するものをスクリーニングすることを本研究の第一の目的とした (研究 1)。さらに、訪問先研究者が持つ植物病原糸状菌の解析技術 (感染細胞の電子顕微鏡観察、高効率な形質転換法) の習得及び新規技術の共同開発を第二の目的とした (研究 2)。

## 3. 研究の方法

研究 1: EV 分泌へのエフェクター分泌阻害剤の影響の評価については、O'Connell 博士が確立した EV マーカーを利用した。炭疽病菌は宿主細胞侵入時に感染の専門細胞である付着器を分化させ、そこから penetration peg を形成し、植物細胞へ侵入する。O'Connell 博士は、Penetration peg 形成時に形成される EV に局在するタンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現する炭疽病菌の EV マーカー発現株を作出した。エフェクター分泌阻害剤の EV 分泌への影響を、この EV マーカーの発現・局在の変化の有無で評価した。

研究 2: Richard O'Connell 博士のグループでは Jean-Felix Dallery 博士らが中心となってアブラナ科炭疽病菌の高効率な形質転換手法を開発していた。アブラナ科炭疽病菌の

高効率な形質転換手法は、申請者が開発した多重遺伝子破壊法と組み合わせることで、効率的に複数の遺伝子を破壊する新技術開発することが期待できた。そこで申請者の多重遺伝子破壊法と O'Connell 博士のグループが持つ高効率形質転換法を組み合わせた高効率多重遺伝子破壊法の開発を試みた。

#### 4. 研究成果

研究 1: 炭疽病菌の EV マーカーの局在・発現に対するエフェクター分泌阻害剤の影響は見られなかった。申請者は基課題においてどう同定した炭疽病菌のエフェクター分泌および病斑サイズを抑制する 7 つの化合物をそれぞれ炭疽病菌の EV マーカー発現株に作用させ、EV マーカーの発現・局在を観察し、コントロールの未処理株と比較した。いずれのエフェクター分泌阻害剤についても、EV マーカーの局在・発現への影響は認められなかった。このことからエフェクター分泌阻害剤の作用標的が今回用いた EV マーカーとは異なる種類の EV に作用する可能性や、EV 分泌とは独立した経路に存在する可能性が示唆された。

研究 2: アブラナ科炭疽病菌の高効率な形質転換法を開発者である Jean-Felix Dallery 博士から直接習得した。同時に申請者は Jean-Felix Dallery 氏にアブラナ科炭疽病菌において自ら開発した *URA3* 遺伝子を用いた多重遺伝子破壊法に必要な *ura3* 変異体および多重遺伝子破壊手法を伝えた。この 2 つの手法は効果的に機能し、これまで遺伝子破壊が困難だったアブラナ科炭疽病菌において、遺伝子破壊効率が 30-100% の多重遺伝子破壊法の確立に成功した。本手法は、これまで低い遺伝子破壊効率と遺伝子の冗長性のため、解析が困難だったアブラナ科炭疽病菌の病原性に寄与する遺伝子の同定への貢献が期待できる。本技術についてはすでに *Molecular Plant Pathology* 誌において受理された。

その他の研究: ホスト研究者との議論や蓄積された知見の習得により、申請者の炭疽病菌研究は大きく推進することができた。研究 2 で開発した技術と同様の CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術を用い、申請者が共筆頭著者の論文 (Chen\*, Kumakura\* et al., *eLife*, 2023) や筆頭著者の論文 (Kumakura\* et al., *New Phytologist*, 2024) の発表へとつながった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kumakura Naoyoshi, Singkaravanit Ogawa Suthitar, Gan Pamela, Tsushima Ayako, Ishihama Nobuaki, Watanabe Shunsuke, Seo Mitsunori, Iwasaki Shintaro, Narusaka Mari, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 242
2. 論文標題 Guanosine specific single stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 170 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.19582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yonehara Katsuma, Kumakura Naoyoshi, Motoyama Takayuki, Ishihama Nobuaki, Dallery Jean Felix, O'Connell Richard, Shirasu Ken	4. 巻 24
2. 論文標題 Efficient multiple gene knockout in Colletotrichum higginsianum via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and URA3 based marker recycling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yonehara Katsuma, Kumakura Naoyoshi, Motoyama Takayuki, Ishihama Nobuaki, Dallery Jean-Felix, O'Connell Richard, Shirasu Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficient multiple gene knock-out in Colletotrichum higginsianum via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and URA3-based marker recycling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.04.20.537420	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen Mingming, Kumakura Naoyoshi, Saito Hironori, Muller Ryan, Nishimoto Madoka, Mito Mari, Gan Pamela, Ingolia Nicholas T, Shirasu Ken, Ito Takuhiro, Shichino Yuichi, Iwasaki Shintaro	4. 巻 12
2. 論文標題 A parasitic fungus employs mutated eIF4A to survive on rocaglate-synthesizing Aglaia plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.81302	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsushima Ayako, Narusaka Mari, Gan Pamela, Kumakura Naoyoshi, Hiroyama Ryoko, Kato Naoki, Takahashi Shunji, Takano Yoshitaka, Narusaka Yoshihiro, Shirasu Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 The Conserved Colletotrichum spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.682155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumakura Naoyoshi, Singkaravanit-Ogawa Suthitar, Gan Pamela, Tsushima Ayako, Ishihama Nobuaki, Watanabe Shunsuke, Seo Mitsunori, Iwasaki Shintaro, Narusaka Mari, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.10.13.464185	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gan Pamela, Hiroyama Ryoko, Tsushima Ayako, Masuda Sachiko, Shibata Arisa, Ueno Akiko, Kumakura Naoyoshi, Narusaka Mari, Hoat Trinh Xuan, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 23
2. 論文標題 Telomeres and a repeat rich chromosome encode effector gene clusters in plant pathogenic Colletotrichum fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 6004 ~ 6018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Jinlian, Inoue Yoshihiro, Kumakura Naoyoshi, Mise Kazuyuki, Shirasu Ken, Takano Yoshitaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative transient expression analyses on two conserved effectors of <i>Colletotrichum orbiculare</i> reveal their distinct cell death inducing activities between <i>Nicotiana benthamiana</i> and melon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yonehara Katsuma, Naoyoshi Kumakura, Shirasu Ken
2. 発表標題 Toward identification of host cell death inducing genes in an NLR dependent manner in <i>Colletotrichum higginsianum</i>
3. 学会等名 32nd Fungal Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yonehara Katsuma, Naoyoshi Kumakura, Shirasu Ken
2. 発表標題 Toward identification of host cell death-inducing genes of <i>Colletotrichum higginsianum</i> via transient gene expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> leaves
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Nobuaki Ishihama, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Shintaro Iwasaki, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌の分泌性リボヌクレアーゼは宿主植物の免疫反応を増強する
3. 学会等名 令和六年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yonehara, Katsuma; Kumakura, Naoyoshi; Motoyama, Takayuki; Dallery, Jean-Felix; O'Connell, Richard; Shirasu, Ken
2. 発表標題 アブラナ科炭疽病菌におけるCRISPR-Cas9システムを用いたマーカーリサイクリング法による多重遺伝子破壊法の開発
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yonehara, Katsuma;Kumakura, Naoyoshi;Gan, Pamela Hui Peng;Shirasu, Ken
2. 発表標題 Towards identification of virulence factors contributing to the necrotrophic phase of Colletotrichum orbiculare
3. 学会等名 16th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kumakura, Naoyoshi;Singkaravanit-Ogawa, Suthitar;Gan, Pamela;Tsushima, Ayako;Ishihama, Nobuaki;Watanabe, Shunsuke;Seo, Mitsunori;Iwasaki, Shintaro;Narusaka, Mari;Narusaka, Yoshihiro;Takano, Yoshitaka;Shirasu, Ken
2. 発表標題 Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses
3. 学会等名 16th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊倉直祐
2. 発表標題 植物病原糸状菌研究の壁 ~炭疽病菌の事例~
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会若手の会 第10回ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊倉直祐
2. 発表標題 共働き夫婦の海外留学・家事育児分担の一事例
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会 シンポジウム ライフイベントとキャリアパス 結婚・出産・育児は選択の連続、その中でどのような選択をしてきたかのリアルな体験談 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊倉直祐
2. 発表標題 植物二次代謝物を介した植物-糸状菌間の軍拡競争
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura
2. 発表標題 Identification of secondary metabolite synthesis genes involved in virulence of Colletotrichum fungi using a multiplex gene disruption system
3. 学会等名 Seminar at BIOGER in INRAE (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Nobuaki Ishihama, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Shintaro Iwasaki, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu
2. 発表標題 Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊倉直祐、Mingming Chen、Ryan Muller、七野悠一、西本まどか、水戸麻理、Pamela Gan、Nicholas T. Ingolia、白須賢、伊藤拓宏、岩崎信太郎
2. 発表標題 Rocaglateを生合成するアグラリア属植物に寄生する糸状菌は変異型eIF4Aを利用して生存する
3. 学会等名 熊倉直祐、Mingming Chen、Ryan Muller、七野悠一、西本まどか、水戸麻理、Pamela Gan、Nicholas T. Ingolia、白須賢、伊藤拓宏、岩崎信太郎
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 米原克磨、熊倉直祐、Pamela Gan、白須賢
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌感染における殺生段階成立に必要な病原性因子の探索
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
オコネル リチャード  (O'Connell Richard)	フランス国立農業・食糧・環境研究所・BIOGER・Group leader	

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
ダラリー ジーンフェリックス  (Dallery Jean-Felix)	フランス国立農業・食糧・環境研究所・BIOGER・Researcher	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

フランス	INRAE			
------	-------	--	--	--