

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ~ 2009

課題番号：20780032

研究課題名（和文）植物病原性糸状菌および卵菌の病原性発現における活性酸素生成の役割

研究課題名（英文）Role of reactive oxygen species in infection of fungal and oomycete plant pathogens.

研究代表者

竹本 大吾 (TAKEMOTO DAIGO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：30456587

研究成果の概要（和文）：植物病原性、共生性糸状菌の生成する活性酸素が、植物への感染に必須であることが示されている。本研究では、糸状菌の活性酸素生成酵素 Nox の制御因子の単離と機能解析を行った。その結果 Nox 制御因子である NoxR と相互作用する RacA、BemA、Cdc24 を単離し、さらに BemA と相互作用する Cdc42 を見出した。これら因子の遺伝子破壊株の表現型や細胞内局在性の解析から、Nox 制御因子が植物感染時の細胞末端での活性酸素生成を制御し、細胞極性の確立に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Regulated synthesis of reactive oxygen species (ROS) by fungal NADPH oxidases (Nox) plays a key role in interactions of pathogenic and symbiotic fungi with host plants. In this study, we isolated and investigated the function of novel regulator of fungal Nox. Generation of ROS by fungal Nox enzymes requires assembly of a multi-subunit complex composed of NoxA, NoxR, and RacA. Interaction assays showed that NoxR interacts with RacA, BemA and Cdc24, and Cdc42 interacts with BemA. BemA, Cdc24, NoxR and RacA preferentially localized to hyphal tips. These results demonstrate that fungal BemA and Cdc24 play a critical role in localizing and activating Nox proteins, in order to establish polarity of fungal hyphal cells during the infection to host plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：糸状菌、植物病原菌、植物共生菌、活性酸素生成酵素、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類や植物において、NADPH oxidase

(Nox)によって生成される活性酸素種は、形態形成、ホルモン応答やアポトーシスなど様々な生理的現象を制御する情報伝達因子

であることが知られている。糸状菌においても、生殖器官形成、胞子発芽や菌糸分岐の制御に活性酸素を介した情報伝達が重要な役割を担っていることが示されている。近年、*nox* 破壊株の解析などから、様々な病原糸状菌で活性酸素生成が病原性発現に不可欠であることが示唆されている。また申請者らは、先に牧草と共生する糸状菌 *Epichloë festucae* の活性酸素生成酵素 NoxA が植物への感染確立に必須であることを見出している。しかし、糸状菌の活性酸素生成の制御機構や植物への感染確立における具体的な役割についてはこれまでに殆ど明らかになっていない。

そこで、糸状菌の Nox による活性酸素生成を制御する因子の単離と機能解析によって、植物感染性糸状菌の感染における活性酸素の機能を明らかにすることを目指して本研究課題を設定した。

2. 研究の目的

植物感染性糸状菌によって生成される活性酸素の感染確立における役割と、糸状菌による活性酸素生成酵素の制御機構の全容を明らかにすることを最終目標として、以下に示す課題を設定した。

- (1) 新規な活性酸素生成酵素制御因子の単離
- (2) 制御因子の相互作用の詳細な解析
- (3) 制御因子の遺伝子破壊株の感染能の解析
- (4) 制御因子の菌糸細胞内での局在性の解明
- (5) 糸状菌による活性酸素生成の定量化

3. 研究の方法

(1) 糸状菌ゲノムデータベースの解析による NoxR 相互作用因子の探索

糸状菌 NoxR は、Nox 活性化ドメイン (AD) とタンパク質相互作用に関わる 2 つの領域、tetratricopeptide repeat (TPR) モチーフと PB1 (Phox and Bem1) ドメインを持つ(図 1)。TPR モチーフに低分子量 G タンパク質 RacA が結合し、この NoxR-RacA の結合が NoxA による活性酸素生成に必要であることが解っている。一方、NoxR の C 末端にある PB1 ドメインの機能はまだ明らかではないが、PB1 ドメインに結合するタンパク質が、NoxA-NoxR-RacA による活性酸素の局在的生成を制御すると予想される。PB1 ドメインは他の PB1 ドメインと結合することが知られていることから、糸状菌のゲノム配列から PB1 ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子を網羅的に検出し、相互作用因子の候補とした。

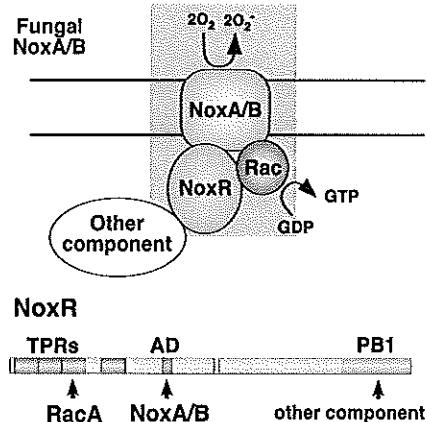


図 1 (上) Nox とその制御因子
(下) NoxR の構造と相互作用ドメイン

(2) Yeast two hybrid 法を用いたタンパク質相互作用の検出

計画 1 で見出した PB1 ドメインを持つ糸状菌タンパク質遺伝子を単離し、Yeast two hybrid 法に用いるベクターに各遺伝子を導入した。得られたベクターを用いて候補タンパク質と NoxR の相互作用の有無を検出した。また相互作用が検出された場合は、各タンパク質の部分長遺伝子をもちいた結合解析により、結合ドメインの特定を行った。

(3) 制御因子の遺伝子破壊株の作出と表現型の解析

計画 2 によって得られた NoxR 相互作用因子の欠損変異株を、相同組み替えを利用した特異的遺伝子破壊法を用いて作出了。得られた形質転換体から PCR 法およびサザンプロット法を用いて、目的の遺伝子が破壊されている株を選抜した。得られた欠損変異株の培地上での生育、菌糸の分岐等の形質の解析を行った。また宿主植物に接種後の感染確立能や宿主植物内での生育などについて詳細に観察した。またこれら Nox 欠損変異株の活性酸素生成能を活性酸素検出試薬である NBT や L012などを用いて調査し、野生株の活性酸素生成と比較をした。

(4) 制御因子の菌糸細胞内での局在性の解明

NoxR、RacA および計画 2 によって得られた NoxR 相互作用因子と GFP の融合タンパク質を過剰発現プロモーターの制御下で糸状菌内で発現する形質転換体を作出した。得られた形質転換体のうち GFP の発現量が高い株を選抜し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、各タンパク質の菌糸生育時および分岐発生時の細胞内局在性を観察した。

4. 研究成果

(1) 活性酸素生成酵素 NoxA の新たな制御因子の単離

共生糸状菌 *E. festucae* の活性酸素生成酵素 NoxA とその制御因子 NoxR、RacA が共生時の植物内での菌糸生育の制御に重要であることをこれまでに示している。NoxR は、RacA との結合に必要な TPR ドメイン、NoxA 活性化ドメインを N 末端側に保持し、C 末端には機能未知なタンパク質相互作用ドメイン (PB1) を持つ。PB1 ドメインは他の PB1 ドメインと結合することが知られていることから、*E. festucae* のゲノム配列から見いだされた PB1 ドメインを持つ 4 つのタンパク質が NoxR の PB1 ドメインと結合すると推定された。Yeast two hybrid 法を用いてこれら遺伝子産物の相互作用を詳細に検討したところ、NoxR-Cdc24、Cdc24-BemA、NoxR-NoxR の組み合わせで各 PB1 ドメインが結合することが示された。この結果より Cdc24、BemA が新たな NoxA 制御因子の候補としてして同定された。また PB1 ドメイン以外の部位を介して NoxR と BemA が相互作用をすることが見出された。これら因子の相互作用は、免疫沈降をもじめた相互作用解析においても確認された (図 2)。

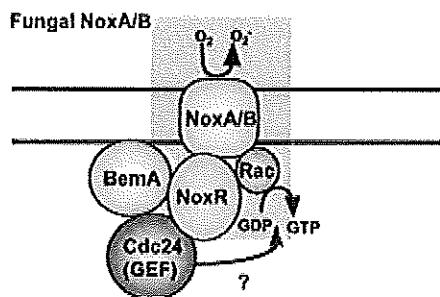


図 2 糸状菌の Nox と本研究で単離された制御因子の相互作用の模式図

(2) 新規 NoxA 制御因子の細胞内局在性の解析

新たに単離した NoxA 制御候補因子 BemA、Cdc24 および NoxR、RacA と GFP の融合タンパク質を *E. festucae* で発現したところ、これらタンパク質は菌糸先端や菌糸が分岐する部位に局在し、特に NoxR は菌糸が伸長時にのみ菌糸先端に局在化することが解った。この結果は、これら NoxA 制御因子が菌糸先端での活性酸素生成に関与することを示唆した (図 3)。

(3) 新規 NoxA 制御因子の BemA の機能解析

BemA および Cdc24 の遺伝子破壊ベクターを作製し、破壊株の単離を試みたところ、BemA でのみ破壊株が単離された。この結

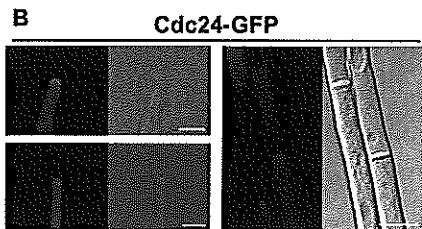
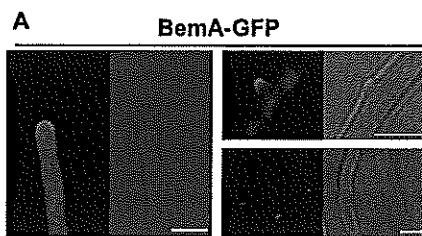


図 3 新規 Nox 制御因子の細胞内局在性
(A) BemA-GFP (B) Cdc24-GFP

果は、Cdc24 が糸状菌の生育に必須である事を示していると考えられた。*bemA* 破壊株を *E. festucae* の宿主植物であるペレニアルライグラスに接種したところ、*noxA* 破壊株、*noxR* 破壊株と同様に宿主植物の矮化が認められ、BemA が NoxA の制御因子であり事が強く示唆された。

(4) RacA と Cdc42 の活性酸素生成における機能の解析

NoxA の活性化因子である RacA は、低分子量 G タンパク質である。*E. festucae* のゲノム配列を解析したところ、RacA と極めて相同意の高い Cdc42 が見出された。RacA と Cdc42 が協調的に活性酸素生成や菌糸生育を制御している可能性が推定されたため、*E. festucae* の RacA と Cdc42 の機能分化について調査した。Cdc42 および RacA と NoxA 制御因子の相互作用を Yeast two hybrid 法により調べたところ、NoxR-RacA、BemA-Cdc42 の特異的な結合が検出された。そこで、*cdc42* 破壊株を作出し、活性酸素生成量を調べたところ、野生株と比較して *cdc42* 破壊株では生成量の増加が認められた。*racA* 破壊株では活性酸素生成量が低下することから、この結果

より、NoxA による活性酸素生成は 2 種類の相同性の高い低分子量 G タンパク質である RacA と Cdc42 によって拮抗的に制御されていることが示唆された (図 4)。

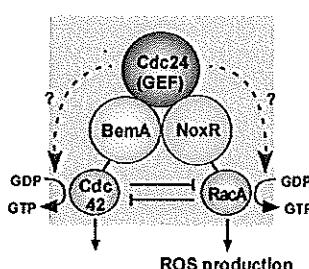


図 4 RacA と Cdc42 による拮抗的活性酸素生成制御のモデル

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4件)

- ①Shibata Y., Kawakita K. and Takemoto D.. (2010) Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* in press. 査読有
- ②Uruma S., Shibata Y., Takemoto D. and Kawakita K. (2009) N,N-dimethylsphingosine, an inhibitor of sphingosine kinase, induces phytoalexin production and hypersensitive cell death of Solanaceae plants without generation of reactive oxygen species. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 257-266. 査読有
- ③Hardham A.R., Takemoto D. and White R.G. (2008) Rapid and dynamic subcellular reorganization following mechanical stimulation of *Arabidopsis* epidermal cells mimics responses to fungal and oomycete attack. *BMC Plant Biology* 2008, 8: 63. 査読有
- ④Tanaka A., Takemoto D., Hyon G.-S., Park P. and Scott B (2008) NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Mol. Microbiol.* 68: 1165–1178. 査読有り

〔学会発表〕(計29件)

- ①樋野友香・川北一人・竹本大吾.牧草共生菌 *Epichloë festucae* の低分子量Gタンパク質 Cdc42の機能に関する研究. 平成22年度日本植物病理学会大会. 国立京都国際会館. 京都市. 2010.4.19
- ②柴田裕介・川北一人・竹本大吾.ベンサミアナタバコのジャガイモ疫病菌に必須な新規遺伝子の探索. 平成22年度日本植物病理学会大会. 国立京都国際会館. 京都市. 2010.4.19
- ③Monjil M.S., Takemoto D. and Kawakita K. Eliciting activity of NO producing elicitor candidates on potato and *Nicotiana benthamiana*. 平成22年度日本植物病理学会大会. 国立京都国際会館. 京都市. 2010.4.19
- ④柴田裕介・川北一人・竹本大吾.ベンサミア

ナタバコにおけるジャガイモ疫病菌抵抗性関連遺伝子の網羅的解析. 平成22年度日本植物生理学会. 熊本大学. 熊本市. 2010.3.18

- ⑤竹本大吾.糸状菌の宿主感染と植物の抵抗反応における活性酸素の役割. 平成21年度東海植物病学研究会.パレスホテル掛川. 掛川市. 2009.12.4
- ⑥赤野史岳・川北一人・竹本大吾.植物共生糸状菌 *Epichloë festucae* のもつ細胞死誘導タンパク質遺伝子 *NLP* の相同遺伝子は細胞死誘導活性を失う変異を持つ. 第9回糸状菌分子生物学コンファレンス. 東京大学. 東京. 2009.11.18
- ⑦潮田遼・川北一人・竹本大吾.植物病原および共生糸状菌の菌糸伸長時および宿主植物感染過程におけるカルシウムイオン濃度変動と活性酸素生成の関与. 第9回糸状菌分子生物学コンファレンス. 東京大学. 東京. 2009.11.18
- ⑧赤野史岳・川北一人・竹本大吾.牧草共生糸状菌のもつ細胞死誘導タンパク質遺伝子 *NLP* の相同遺伝子は細胞死誘導活性を失う変異を持つ. 平成21年度日本植物病理学会関西部会. 神戸大学.神戸. 2009.10.17
- ⑨潮田遼・川北一人・竹本大吾.糸状菌の菌糸伸長時および宿主植物感染過程におけるカルシウムイオン濃度変動と活性酸素生成の関与. 平成21年度日本植物病理学会関西部会. 神戸大学.神戸. 2009.10.17
- ⑩原祐太・柴田裕介・竹本大吾・川北一人.ベンサミアナタバコのジャガイモ疫病菌抵抗性と活性酸素生成における、低分子量および3量体Gタンパク質の関与. 平成21年度日本植物病理学会関西部会. 神戸大学.神戸. 2009.10.17
- ⑪柴田裕介・川北一人・竹本大吾.ベンサミアナタバコのジャガイモ疫病菌抵抗性におけるRタンパク質関連因子の関与. 平成21年度日本植物病理学会関西部会. 神戸大学.神戸. 2009.10.17
- ⑫赤野史岳・川北一人・竹本大吾.GFP発現ベクターを用いた *Epichloë festucae* 共生確立能欠損変異株のスクリーニング. 平成21年度日本植物病理学会大会. 山形県生涯学習センター. 山形市. 2009.3.27
- ⑬加藤大明・竹本大吾・森仁志・川北一人.ジャガイモ葉におけるS-ニトロソ化され

得るタンパク質の特定. 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 山形県生涯学習センター. 山形市. 2009.3.27

⑭樹神博士・竹本大吾・川北一人 ペルオキシ亞硝酸イオン(ONOO-) の植物抵抗反応への関与. 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 山形県生涯学習センター. 山形市. 2009.3.27

⑮潮田遼・川北一人・竹本大吾.病原糸状菌および共生糸状菌の菌糸成長時および宿主植物感染過程におけるカルシウムイオンの濃度変動. 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 山形県生涯学習センター. 山形市. 2009.3.27

⑯柴田裕介・川北一人・竹本大吾.ジャガイモ疫病菌に対するベンサミアナタバコ植物の防御応答におけるサリチル酸およびエチレンの関与. 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 山形県生涯学習センター. 山形市. 2009.3.27

⑰竹本大吾・Sanjay Saikia・田中愛子・川北一人・Barry Scott 牧草共生菌 *Epichloë festucae* の共生確立に必要な活性酸素生成酵素の新たな制御因子の単離. 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 山形県生涯学習センター. 山形市. 2009.3.26

⑱加藤大明・竹本大吾・森仁志・川北一人. ジャガイモ葉における S-ニトロソ化されるタンパク質の探索. 平成 21 年度日本植物生理学会. 名古屋大学. 名古屋市. 2009.3.21

⑲樹神博士・加藤大明・竹本大吾・川北一人. ペルオキシ亞硝酸イオン(ONOO-) の植物抵抗反応への関与. 平成 21 年度日本植物生理学会. 名古屋大学. 名古屋市. 2009.3.21

⑳柴田裕介・閨間貞雄・竹本大吾・川北一人. N,N-ジメチルスフィンゴシンは活性酸素を介さずに植物の防御応答を誘導する. 平成 21 年度日本植物生理学会. 名古屋大学. 名古屋市. 2009.3.21

㉑Takemoto D., Saikia S., Tanaka A., Wren R. and Scott B. Isolation of new components of the *Epichloë festucae* NADPH pxydase complex. 25th Fungal Genetics Conference, Asilomar. 2009.3.20

㉒Tanaka A., Saikia S., Cartwright G., Takemoto D., Tsuge T. and Scott B. Identification of a

transcription factor regulating hyphal differentiation and growth in *Epichloë festucae*, a mutualistic symbiont of temperate grasses. 25th Fungal Genetics Conference, Asilomar. 2009.3.20

㉓Saikia S., Takemoto D., Tapper B., Lane G. and Scott B. Functional analysis of indole diterpene biosynthesis in the grass endosymbiont *Epichloë festucae*. 25th Fungal Genetics Conference, Asilomar. 2009.3.20

㉔Takemoto D., Saikia S., Tanaka A., Wren R. and Scott B. Bem1 and Cdc24: additional components of the *Epichloë festucae* NADPH oxidase complex? 25th Fungal Genetics Conference, Asilomar. 2009.3.20

㉕閨間貞雄・柴田裕介・竹本大吾・川北一人. N,N-ジメチルスフィンゴシンは活性酸素を介さずに植物の防御応答を誘導する. 平成 20 年度日本植物病理学会関西部会. 和歌山. 和歌山市. 2008.9.18

㉖竹本大吾.牧草共生糸状菌の共生確立機構. 平成 20 年度植物感染生理談話会. 余暇活用センター. 茨城県久慈郡. 2008.8.9

㉗Takemoto D. Identification of new components of the fungal NADPH oxidase complex in the endophytic fungus *Epichloë festucae*. 25th Gordon Research Conference of Cellular & Molecular Fungal Biology, Holderness. 2008.7.30

㉘竹本大吾.牧草共生糸状菌の共生確立における活性酸素の役割. 第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会. 国立京都国際会館. 京都市. 2008.6.19

㉙竹本大吾. 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の共生確立における活性酸素生成の役割. 第 24 回医学生物学電子顕微鏡学会学術講演会および総会. 横浜歯科大学. 横須賀市. 2008.5.18

[図書] (計 3 件)

- ①Scott B., Wren R.E., May K.J., Takemoto D., Young C.A., Tanaka A., Fleetwood D.J., Johnson R.D. (2010) Regulation and functional analysis of Bioprotective metabolite genes from the grass symbiont *Epichloë festucae*. Recent developments in management of plant diseases, Plant Pathology in the 21st century. Springer. 199-213.

②川北一人・加藤大明・樹神博士・柴田裕介・
竹本大吾 (2009) 「植物の感染防御応答と
NO」 実験医学増刊 活性酸素シグナルと酸
化ストレス.羊土社.東京. 232-237.

③竹本大吾・田中愛子・Barry Scott (2008) 牧
草共生糸状菌の共生確立機構 活性酸素生
成の役割について. ゲノム情報を活用した
植物感染生理学の展望. 石井英夫ら編, 日
本植物病理学会, 東京, 44: 131-138.

[その他]
ホームページ等
<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~byori/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹本 大吾 (TAKEMOTO DAIGO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号 : 30456587