

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02989

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の形態形成と感染適応戦略のネットワーク解析

研究課題名（英文）Network analysis of morphogenesis and Infection strategies in plant pathogenic filamentous fungi

研究代表者

久保 康之（Kubo, Yasuyuki）

摂南大学・農学部・教授

研究者番号：80183797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ウリ類炭疽病菌の感染適応戦略に関わるネットワーク機構を解明することを目的とし研究を行った。その結果、付着器形成時にペルオキシダーゼと共役するタンデム型のアルコール酸化酵素が植物表層由来の長鎖脂肪酸を酸化し、生じた長鎖アルデヒドが侵入時の病原性関連因子発現のシグナルとなることを見出した。さらに、炭疽病菌におけるSsd1タンパク質のストレス顆粒形成と相分離への関与を評価するために、RNA結合タンパク質Pbp1をコードする遺伝子変異株の病原性の評価をしたところ、病原性の微弱な低下を確認した。一方、付着器の液胞におけるステロール輸送機能が付着器侵入時における貫穿孔形成に関わっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ウリ類炭疽病菌の感染適応戦略に関わるネットワーク機構を解明することを目的としました。学術的意義として、付着器形成時にペルオキシダーゼと共役するアルコール酸化酵素が植物表層由来の長鎖脂肪酸を酸化し、生じた長鎖アルデヒドが侵入時の病原性関連因子発現のシグナルとなることを世界で初めて明らかにしました。また、植物病原菌の細胞小胞や細胞小器官の機能が病原性に関連することを示しました。これらの発見は、病原菌の感染メカニズムを理解し、農作物の病害管理に新たな視点を提供するものです。社会的意義として、持続可能な農業と食料安全保障の向上に寄与し、農作物の損失を減少させるための基盤研究となります。

研究成果の概要（英文）：We conducted a study with the aim of elucidating the network mechanisms involved in the infection strategies of the anthracnose fungus in cucurbits. We found that a tandem-type alcohol oxidase, which conjugates with peroxidase during appressorium formation, oxidizes long-chain fatty acids derived from the plant surface. The resulting long-chain aldehyde serves as a signal for the expression of pathogenicity-related factors during invasion. Furthermore, to evaluate the involvement of the Ssd1 protein in stress granule formation and phase separation in the anthracnose fungus, we assessed the pathogenicity of mutant strains encoding the RNA-binding protein Pbp1. A slight reduction in pathogenicity was observed. On the other hand, we found that the sterol transport function in the vacuole of the appressorium is involved in the formation of penetration pegs during appressorium invasion.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原糸状菌 炭疽病菌 形態形成 病原性 シグナル受容

1. 研究開始当初の背景

植物病害の70%は病原糸状菌の感染によるものであり、世界の食糧生産のうち植物の病気による損失は12%に達する。植物病原糸状菌である炭疽病菌は70以上の種から構成され、多様な農作物に感染し、深刻な被害を与えている。また、炭疽病菌はイネの最重要病害であるイネいもち病菌と類似した感染形態をとり、病原糸状菌の感染適応戦略理解のモデル系としての特質をも備えている。さらに炭疽病菌は、植物への感染過程で一連の感染器官の劇的な形態分化を行い、宿主との相互作用を経て感染を成立させる特徴を有する。研究代表者は、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) の病原性、侵入器官の形態形成に関与する遺伝子の同定と機能解析を進め、シグナル伝達、細胞極性制御、メラニン合成系、ペルオキシソーム機能、細胞壁構成制御、エフェクター機能などに関わる遺伝子が植物への感染に重要な役割を担っていることを先導的成果として明らかにしてきた。とくに、近年の研究成果により、NDR キナーゼ経路を介して病原菌が植物との相互応答の過程で極めて精緻な感染戦略を発達させていることを見出し、てきた。

2. 研究の目的

本研究は病原糸状菌の感染戦略における宿主認識と感染器官の形態形成の分子機構に関する研究を行い、植物表層認識から形態形成に至る精緻な制御機構を細胞内の「相分離」という関連分野の学問的新知見とポストゲノム研究における技術的飛躍により解明し、病原糸状菌の感染適応戦略の分子レベルでの理解を飛躍的に進めることを目的とする。本菌のゲノム情報の可能性を最大限に生かしたオミックス解析の追求と順遺伝学的アプローチ、さらに分子細胞学的解析を組み合わせ、植物病原糸状菌の植物への感染適応戦略の分子モデルを構築する。これにより、創薬の新規有効ターゲットになる病原菌の分子経路の掌握など病害防除における基盤的成果を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 植物表層環境の認識と侵入器官形成を制御するシグナル受容とネットワーク解析

植物表層シグナル受容と形態形成に関して、植物表層のクチンモノマーを受容し、Pag1 Scaffold タンパク質により活性制御される NDR1 キナーゼとその下流の転写因子 Mtf4 を同定し、シグナル受容経路の骨格を明らかにしてきた。また、物理的シグナル受容に関与する Kel2 が細胞伸長先端方向へ細胞骨格を通じて外側方向に運ばれることに対して、植物シグナル受容に関わる Pag1 が伸長部位の周縁でエンドサイトーシスの関与により細胞の内側方向に移動局在することが、明らかになってきた。シグナルネットワーク機構のダイナミズムを新規因子の同定と細胞学的アプローチで追求した。

(2) 病原糸状菌の感染器官の形態形成における NDR キナーゼネットワークの細胞内相分離および細胞小器官の関与

ヒトの Ataxin2 の相同タンパク質である出芽酵母の RNA 結合タンパク質 Pbp1 のウリ類炭疽病菌相同遺伝子 CoPBP1 の存在を遺伝子情報から確認している。一方、出芽酵母において Pbp1 の C 末端側にあるメチオニンリッチな LC ドメインが RNA 顆粒の相分離に関与していることが明らかにされている。CoPBP1 遺伝子に変異を導入し、蛍光顕微鏡観察により、液相-ゲル相分離の評価を試みた。さらに、変異株の形態形成、病原性について評価し、植物病原菌における相分離の役割に関する先行成果を得る。また、これまで細胞周期制御因子が炭疽病菌の病原性に重要であることを明らかにしている。本研究では細胞周期因子の下流で制御されている因子の同定と細胞小器官の機能との関係性について追求した。

4. 研究成果

(1) 植物表層環境の認識と侵入器官形成を制御するシグナル受容とネットワーク解析

NDR キナーゼの制御ネットワークの詳細を解明することを目的とし、NDR キナーゼネットワークに関わる制御因子の解明を進めた。これまで NDR キナーゼは植物表層シグナルとして長鎖アルデヒドを受容し、付着器分化の制御を行う。本年度までに付着器侵入時にペルオキシダーゼと共役するタンデム型のアルコール酸化酵素が付着器侵入時に植物表層にて長鎖脂肪酸を酸化し、生じた長鎖アルデヒドが病原菌侵入時の病原性関連因子発現のシグナルとなることを見出している。本研究課題では炭疽病菌が溶解性多糖モノオキシゲナーゼの一種である二量体 A A 9 A 酵素を感染時に分泌し、付着器侵入を促進させていることを明らかにした。A A 9 A 酵素は三次元構造を持たない「無秩序な」C 末端領域が関与して二量化し、これにより A A 9 A 酵素のセルロースに対する基質結合と活性が増加し、植物表層におけるセルロース分解が炭疽病菌の病原性に重要な働きをしていることを見出した(図 1) (引用文献 1))。

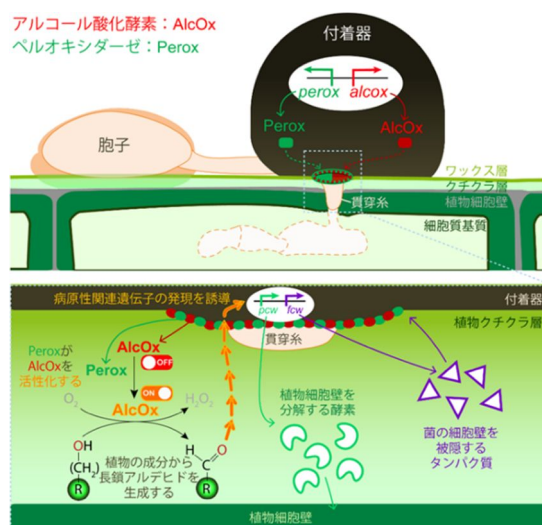


図 1. 分泌性酸化酵素ペアを介した長鎖アルデヒド生成と炭疽病菌の病原性関連遺伝子の発現誘導

(2) 病原糸状菌の感染器官の形態形成における NDR キナーゼネットワークの細胞内相分離および細胞小器官の関与

炭疽病菌における Ssd1 タンパク質のストレス顆粒形成と相分離への関与を評価するために、出芽酵母の RNA 結合タンパク質 Pbp1 のウリ類炭疽病菌相同遺伝子 CoPBP1 に変異を導入し、病原性の評価をしたところ病原性の微弱な低下が確認された。一方、Pbp1 の局在については、標識蛍光が微弱で明確な結果を得られていない。一方、付着器のリソソームにおけるステロール輸送機能が細胞周期制御シグナル伝達の制御下にあること、さらに付着器分化に伴うスフィンゴ脂質代謝系の代謝変動とリンクして付着器侵入時における貫穿孔形成に関わっていることを見

出し、細胞小器官のネットワーク機能の重要性を示唆する結果を得た。

具体的には、貫穿糸の形成には、菌の細胞内で Niemann-Pick type C (NPC) タンパク質を介した適切なステロールの輸送・分配が行われる必要があることを明らかにし、ステロールが適切に分配されることで、貫穿糸の突出に必要なタンパク質の集積が行われることを見出した(図2)(引用文献2)。この成果を基盤として、ステロール輸送機構をターゲットとした新たな防除薬剤の開発につながる可能性が期待される。

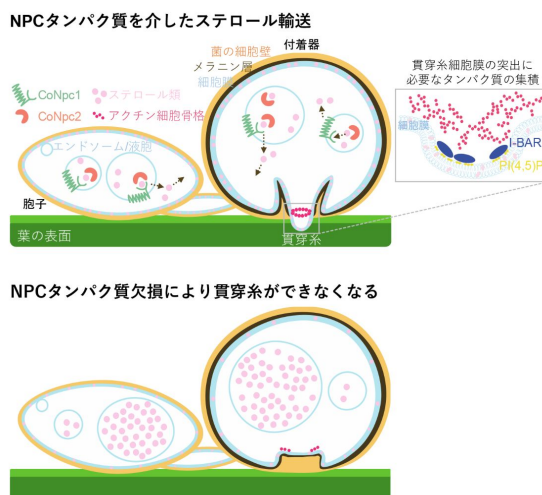


図2 . NPC タンパク質を介したステロール輸送と貫穿糸形成

< 引用文献 >

1) *Bissaro, B., *Kodama, S., Nishiuchi, T., Díaz-Rovira, A. M., Hage, H., Ribeaucourt, D., Haon, M., Grisel, S., Simaan, A. J., Beisson, F., Forget, S. M., Brumer, H., Rosso, M.N., Guallar, V., O'Connell, R., Lafond, M., ****Kubo, Y.** and ****Berrin, J.-G.** Tandem metalloenzymes gate plant cell entry by pathogenic fungi. (2022) Sci. Adv. 8: eade9982 *co-first; **co-correspondence

2) Kodama, S., Kajikawa, N., Fukada, F. and **Kubo, Y.** Niemann-pick type C proteins are required for sterol transport and appressorium-mediated plant penetration of *Colletotrichum orbiculare*. (2022) mBio 13: e02236-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sayo Kodama, Bastien Bissaro, Jean-Guy Berrin and Yasuyuki Kubo	4. 巻 124
2. 論文標題 Plant surface signal sensing and infection-related morphogenesis of <i>Colletotrichum orbiculare</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	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） 10.1016/j.pmpp.2023.101979	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 該当する
1. 著者名 Bastien Bissaro, Sayo Kodama, Takumi Nishiuchi, Anna Maria Diaz-Rovira, Hayat Hage, David Ribeaucourt, Mireille Haon, Sacha Grisel, A. Jalila Simaan, Fred Beisson, Stephanie M. Forget, Harry Brumer, Marie-Noelle Rosso, Victor Guallar, Richard O'Connell, Mickael Lafond, Yasuyuki Kubo and Jean-Guy Berrin	4. 巻 8
2. 論文標題 Tandem metalloenzymes gate plant cell entry by pathogenic fungi	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	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） 10.1126/sciadv.ade9982	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 Sayo Kodama, Fumi Fukada, Naoki Kajikawa, Yasuyuki Kubo	4. 巻 13
2. 論文標題 Niemann-Pick Type C proteins are required for sterol transport and appressorium-mediated plant penetration of <i>Colletotrichum orbiculare</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	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） 10.1128/mbio.02236-2	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 Hiroki Matsuo, Yasuhiro Ishiga, Yasuyuki Kubo and Yosuke Yoshioka	4. 巻 72
2. 論文標題 <i>Colletotrichum orbiculare</i> strains distributed in Japan: race identification and evaluation of virulence to cucurbits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 306-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbs.22011	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 小玉 紗代・久保 康之	4. 巻 6
2. 論文標題 植物病原菌の植物表層認識と感染器官の形成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 66-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yasuyuki Kubo, Sanae Yamashita, Takatoshi Maejima, Honoka Sakamoto, Mami Ogawa, Sayo Kodama, Shingo Nagano, Naoki Kato
2. 発表標題 Melanin biosynthetic polyketide synthase Pks1 of <i>C. orbiculare</i> forms granular-like structure during appressorium formation by self-assembly and essential for melanin biosynthesis
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 Sayo Kodama, Naoki Kajikawa, Fumi Fukada, Yasuyuki Kubo
2. 発表標題 Niemann-Pick type C proteins of <i>Colletotrichum orbiculare</i> : sterol transport and appressorium-mediated infection
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 Sayo Kodama, Bastien Bissaro, Jean-Guy Berrin and Yasuyuki Kubo
2. 発表標題 Plant surface signal recognition and infection-related morphogenesis of <i>Colletotrichum orbiculare</i>
3. 学会等名 16th European Conference on Fungal Genetics SATELLITE WORKSHOP : <i>Colletotrichum</i> workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sayo Kodama, Bastien Bissaro, Jean-Guy Berrin, Yasuyuki Kubo
2. 発表標題 Plant surface signal sensing and infection-related morphogenesis of <i>Colletotrichum orbiculare</i>
3. 学会等名 12th US-Japan Scientific Seminar, Ithaca, USA (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保康之・山下紗苗・前島孝年司・阪本萌乃佳・小川真実・小玉紗代・永野真吾・加藤直樹
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌のメラニン合成ポリケチド合成酵素Pks1は付着器形成時に顆粒状の局在を示す
3. 学会等名 日本植物病理学会 令和4年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小玉紗代・山下紗苗・西内 巧・久保康之
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌のキナーゼ遺伝子PPK1は植物表層成分認識を介した付着器形成に関与する
3. 学会等名 日本植物病理学会 令和4年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久保康之 (編)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 175
3. 書名 農学概論	

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物病原糸状菌の形態形成と感染適応戦略
http://blog.livedoor.jp/beachan_/

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
研究分担者	小玉 紗代 (Kodama Sayo) (10824039)	摂南大学・農学部・助教 (34428)	
研究分担者	西内 巧 (Nishiuchi Takumi) (20334790)	金沢大学・疾患モデル総合研究センター・准教授 (13301)	

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
---------	---------