

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02993

研究課題名(和文) トマト葉かび病菌が分泌する全エフェクターの菌寄生菌に対する網羅的な機能解析

研究課題名(英文) Role of effector proteins secreted by *Cladosporium fulvum* against the mycoparasitic invasion

研究代表者

飯田 祐一郎 (Iida, Yuichiro)

摂南大学・農学部・准教授

研究者番号：00456609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,930,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原菌は宿主植物の防御反応を抑制するために、エフェクターと呼ばれる低分子タンパク質を病原因子として分泌する。一方、エフェクターは抵抗性をもつ植物において病原菌の侵入を感知するターゲットタンパク質であるため、植物の抵抗性誘導因子としても機能してしまうという二面性をもつ。そのためエフェクターは、病原菌と植物との相互作用においてのみ重要とされてきた。我々は植物病原菌のエフェクターが、植物だけでなく他の微生物に対する防御応答においても重要な役割を果たすと考え、トマトの重要病害である葉かび病菌とその菌寄生菌をモデル系に、病原菌エフェクターの「第三の機能」を解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トマト葉かび病菌は抵抗性品種を打破するレース分化が進み、国内で市販されている抵抗性品種はすべて無力化されている。また化学合成殺菌剤に対する耐性菌の発生も報告されており、今後、本病害を効率的に、また環境への負荷の少ない防除法を構築するためには、生物防除技術の確立が必須となる。菌寄生菌 *Hansfordia pulvinata* は、トマト葉かび病菌に対する高い寄生性を示すことから、生物防除剤の有効成分としての可能性を秘めている。本研究は、菌寄生菌の葉かび病菌エフェクターに対する機能を解析することにより、国内外で問題となっている多様化したレースに対する効果が解明され、トマトの安定的な栽培に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Leaf mould, caused by *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*), is a devastating fungal disease of tomato plants, which results in severe defoliation and yield losses under humid glasshouse. During infection, *F. fulva* secretes an arsenal of effector proteins to promote host colonisation and disease. Breeders have introduced Cf resistance genes, which encode receptor-like proteins with extracytoplasmic leucine-rich repeats, into commercial tomato cultivars. Tomato Cf gene encoded receptor-like proteins recognize corresponding effector proteins of *C. fulvum* and trigger a hypersensitive response that inhibits the growth of the biotrophic pathogen and preventing its spread. We hypothesised that the effector proteins secreted by pathogens function not only against plants but also against other microorganisms. In this study, we focused on the effectors of *C. fulvum* and the secreted proteins of the mycoparasite *Hansfordia pulvinata*, which specifically parasitize *C. fulvum*.

研究分野：植物病理学、植物保護学

キーワード：エフェクター トマト葉かび病 菌寄生菌 生物防除 バイオコントロール レース

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌は、植物の抵抗性を回避する特殊な分子戦略を進化させてきた。病原菌は、植物への感染時にエフェクターと呼ばれる低分子タンパク質を病原力因子として分泌し、植物が分泌する細胞壁分解酵素や防御反応を抑制することで、感染を拡大させる。一方、抵抗性品種の場合には、植物の受容体様タンパク質 (RLP) が対応するエフェクターを認識することで病原菌の侵入を感知し、抵抗性が誘導される。抵抗性品種に対抗して病原菌は、エフェクター遺伝子の機能を喪失させることで植物による認識を回避し、再び感染できる新たな系統 (レース) へと分化する。このような病原菌エフェクターと植物の抵抗性の共進化は、軍拡競争に喩えられる。ヒトや動物の病原菌も同様に、病原力因子としてエフェクターを分泌することから、エフェクターは病原菌と宿主間の相互作用において最も重要な因子とされる。

病原糸状菌 *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) によって引き起こされる葉かび病は、世界中のトマト栽培で発生する重要病害である。葉かび病菌は葉の気孔から植物組織内に侵入し、アポプラストを進展する間に多くのエフェクターを分泌する (Mesarich et al. 2023)。トマトに導入された Cf 抵抗性遺伝子群の多くは RLP をコードしており、対応するエフェクターを特異的に認識することが明らかとなっている。しかしながら、抵抗性品種に過度に依存した防除法がとられたことから、エフェクターの変異により抵抗性が徐々に打破され、現在、日本ではレースが 13 種類に分化している (Iida et al. 2015)。葉かび病菌はエフェクターの研究が最も進展している糸状菌のひとつではあるものの、本菌のゲノム上にコードされる 60 を超えるエフェクターのうち、病原力因子としてのタンパク質機能が解明されているものはごくわずかである (Mesarich et al. 2018)。葉かび病菌に限らず、腐生性の植物病原菌の多くは感染できる宿主植物がない場合、土壌などの環境中で他の微生物との生存競争を展開している。我々は、葉かび病菌がこれら微生物との攻防においてエフェクターを利用していると考えた。

本病害は抵抗性品種の無力化だけでなく、化学合成殺菌剤に対する耐性菌の発達も顕在化しており、化学農薬や抵抗性品種に依存しない新たな防除戦略の構築が求められている。我々は栽培施設内で、本病の病斑上に寄生する糸状菌を偶然発見した。形態的特徴や分子系統学的解析から、分離菌は葉かび病菌に寄生することが報告されている菌寄生菌 *Hansfordia pulvinata* と同定された (Iida et al. 2018 Plant Pathol)。そこで本研究では、病原菌エフェクターの機能として明らかとなっている植物に対する病原力因子、抵抗性誘導因子に続く、「第三の機能」として微生物間における防御因子としての機能を、葉かび病菌と菌寄生菌 *H. pulvinata* をモデル系に解析した。

2. 研究の目的

植物病原菌が病原力因子として分泌するエフェクタータンパク質は、宿主植物との相互作用においてのみ重要と考えられてきた。本研究では、病原菌エフェクターにおける病原力因子および抵抗性誘導因子としての機能以外に他の微生物に対する第三の機能の解明を目指す。エフェクター研究が進展し、またレース分化が農業上の大きな問題となっているトマト葉かび病菌と、菌寄生菌 *H. pulvinata* 414-3 株を研究対象とする。葉かび病菌のゲノム上には 60 種以上のエフェクター候補がコードされており、トマト感染時に高発現する (Mesarich et al. 2018)。本研究では、葉かび病菌と *H. pulvinata* における相互作用を解析することで、菌寄生菌に対する防御応答に関わるエフェクターを同定し、そのタンパク質機能を解析する。

3. 研究の方法

菌寄生菌 *H. pulvinata* は、貧栄養の人工培養条件において葉かび病菌に寄生する (Iida et al. 2018 Plant Pathol)。そこで、本寄生条件における共培養 7 日目と 14 日目、および各々の単独培養時の RNAseq トランスクリプトーム解析を行い、葉かび病菌 5Kim 株 (Zuccaron et al. 2022) および *H. pulvinata* 414-3 株 (Sushida et al. 2019) のゲノム情報を用いて発現変動遺伝子 (DEGs) を解析した。また、葉かび病菌が感染したトマト (*Solanum lycopersicum*)、および葉上で葉かび病菌に *H. pulvinata* を寄生させたトマトにおいてもトランスクリプトーム解析を実施し、*in vitro* および *in planta* における葉かび病菌、菌寄生菌、トマトの三者間での DEGs を検出した。これらの中から、葉かび病菌の防御応答に関わるエフェクター遺伝子を同定し、機能解析を行なった。また葉かび病菌の病原性および菌寄生菌の菌寄生性に関わるものが予想される遺伝子について、遺伝子破壊株・過剰発現株を作成し、分子生物学的な機能解析を行なった。

4. 研究成果

(1) *in vitro* および *in planta* 菌寄生時のトランスクリプトーム解析

RNAseq データから得られたリードカウントデータを TPM (transcript per million) に補正し、主成分分析を行なった。その結果、*in vitro* 培養条件における共培養 7、14 日目、およびトマト葉上における遺伝子発現は異なるクラスターを形成した (図 1)。次に、人工培養条件における葉かび病菌および菌寄生菌、またトマト葉上における葉かび病菌および菌寄生菌、トマトの DEGs

を検出した。興味深いことに、培養日数や菌寄生菌の有無で遺伝子発現が大きく変動しただけでなく、培地上と植物体上の寄生条件間でも異なる発現パターンを示し、両条件間で共通した DEGs に *H. pulvinata* の寄生性関連遺伝子が含まれると考えられた。また、これら DEGs の中でも、*H. pulvinata* からの寄生によって、葉かび病菌の多くのエフェクター遺伝子の発現が誘導することが明らかとなった。*in vitro* 寄生条件では 51 遺伝子が、*in planta* 寄生条件では 20 遺伝子が *H. pulvinata* による寄生によって発現が上昇し、葉かび病菌の防御応答に関わる可能性が示された。*in vitro* 寄生条件において高発現したエフェクター遺伝子の中には、Cf 抵抗性を誘導する Avr2、Avr9、Ecp1、Ecp2、Ecp4、Ecp6 などが検出された。特に Avr2 と Ecp6 はシステインプロテアーゼインヒビター、キチンスカベンジャーをそれぞれコードしており、*H. pulvinata* が寄生時に分泌することが予想されるプロテアーゼやキチナーゼへの防御応答としても機能する可能性が示された。*in planta* 寄生条件でも、Cf-4E 抵抗性を誘導する Avr4E が見いだされた。また両者で共通した 13 遺伝子はすべて、タンパク質機能が未だ解明されていないエフェクターであった。今後、これら葉かび病菌エフェクターの菌寄生菌に対する機能を順次、解析する。

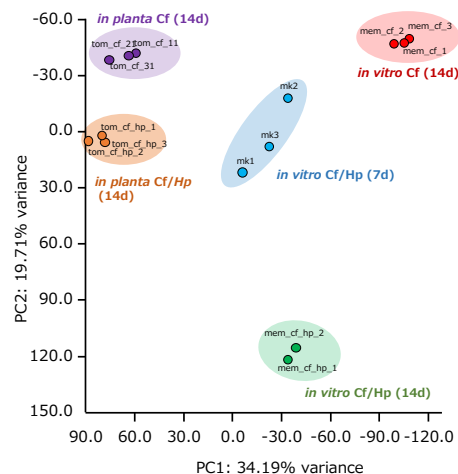


図1. *in vitro* および *in planta* 寄生条件におけるトマト葉かび病菌の発現変動遺伝子。

(2) トマト葉かび病菌の新規エフェクター遺伝子の同定と機能解析

トランスクリプトーム解析の結果、Ecp20-2 遺伝子の発現が *in vitro* 寄生条件で強く誘導されることが明らかとなった。Ecp20-2 は 149 アミノ酸の小さなタンパク質であり、N 末端にシグナルペプチドが予測されたことから、エフェクターとして機能することが示唆された。Ecp20-2 の遺伝子破壊体はトマトに対する病原性が著しく低下したことから、Ecp20-2 が葉かび病菌の病原力因子としても機能する新規エフェクターであることが明らかとなった (Karimi-Jashni et al. 2022)。トマト葉かび病菌 120 菌株において Ecp20-2 遺伝子の SNPs 解析を行なった結果、ゲノム上で複数のリピート配列に囲まれているものの、いずれの菌株においても遺伝子機能を喪失する変異は認められなかった。Ecp20-2 は、土壌病原菌 *Verticillium dahliae* の PevD1 エフェクターと立体構造の高い相同性を示した他、複数の植物病原菌ゲノムにも分布し、植物が分泌する分解酵素のインヒビターとして機能する可能性が示された。

さらに我々は、葉かび病に対する Cf-9 抵抗性に対する新たなエフェクターも同定した (de la Rosa et al. 2024)。トマトの Cf-9 遺伝子座には 5 つの RLP タンパク質が存在するが、それらのうち Cf-9C は、トマト植物の全ての成長段階において抵抗性を発揮し、対応するエフェクター Avr9 が 30 年前に同定されている (van Kan et al. 1991)。一方、花芽形成後の抵抗性を支配する Cf-9B については、対応するエフェクター Avr9B は同定されていなかった。我々は、Cf-9B 抵抗性に対して異なる病原性を示す 2 種のレース菌株について比較ゲノム解析を行い、これまでのエフェクター候補には含まれていなかった Avr9B を同定した。一過性発現系により、Avr9B タンパク質が Cf-9B の存在下でのみ過敏感細胞死を誘導することが明らかとなった (図2)。Avr9 と Avr9B の変異パターンには相関関係があり、近年分離された菌株では Avr9 の機能喪失を伴う変異が検出された一方で古い分離株では Avr9B の変異は観察されなかった。我々は、葉かび病菌が Avr9 および Avr9B を順次変異することで、栽培品種に導入された Cf-9 抵抗性遺伝子座を打破し、世界中で葉かび病菌レースが出現していたことを解明した。

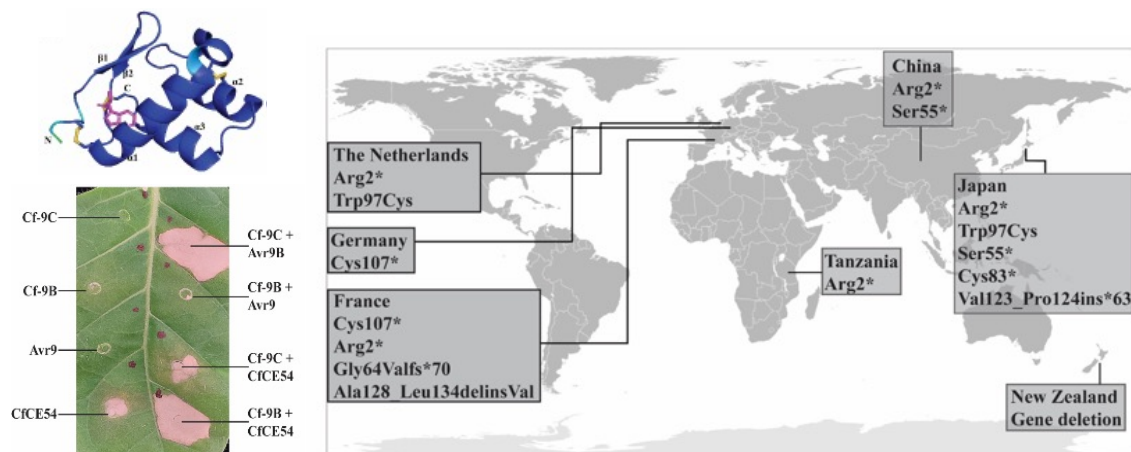


図2. トマト葉かび病菌の新規エフェクター Avr9B. Cf-9B 抵抗性の存在下でのみ過敏感反応を示す。また、世界中の分離株で Avr9 と Avr9B 遺伝子に同じ変異パターンが生じていた。(New Phytologist 誌に掲載された図を改変)

(3) 菌寄生菌の寄生性関連遺伝子の同定と機能解析

菌寄生菌 *H. pulvinata* は葉かび病菌に寄生する際、複数の二次代謝産物の生合成遺伝子群が高発現していることが、トランスクリプトーム解析から明らかとなった (図 1)。*H. pulvinata* は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の孢子形成の誘導因子として同定されたエレモフィラン型セスキテルペン 13-deoxyphomenone を分泌する (Tirilly et al. 1983)。我々は、*H. pulvinata* の効果的な生物防除剤としての開発を目的に、deoxyphomenone 生合成について解析した。同定した deoxyphomenone 生合成 (DPH) 遺伝子クラスターは、*A. oryzae* を含む *Aspergillus* 属のセクション *Flavi* にも保存されており、共通の起源を持つことが明らかとなった (Maeda et al. 2024)。*H. pulvinata*、*A. oryzae* および近縁種 *A. flavus* のセスキテルペンシクラーゼ DPH1 遺伝子の機能欠損実験から、*H. pulvinata* では葉かび病菌に対する外因性の抗真菌活性物質として、*Aspergillus* 属では内因性の孢子形成を制御することが明らかになった。また比較ゲノム解析の結果、これらの DPH 遺伝子クラスターは *Aspergillus* 属の祖先種から菌寄生菌へと水平移動したことが推定された。その結果、*Aspergillus* 属から *H. pulvinata* への転移後に deoxyphomenone が葉かび病菌の孢子発芽や菌糸伸長を阻害するようになり、*H. pulvinata* の菌寄生性の確立に貢献したことが示唆された。

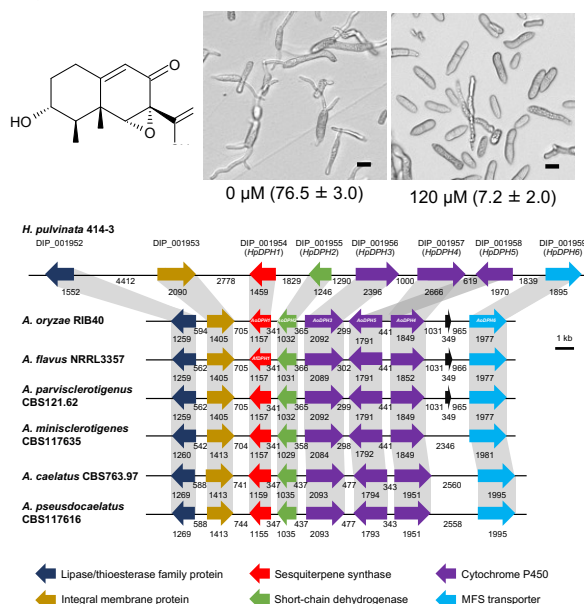


図 3. 菌寄生菌 *H. pulvinata* が分泌するセスキテルペン deoxyphomenone の化学構造. 本化合物は葉かび病菌の孢子発芽を阻害する. 生合成遺伝子クラスターは *Aspergillus* 属セクション *Flavi* にも保存され、菌寄生菌へと水平伝播したことが推定された (Maeda et al. 2024).

引用文献

- Mesarich C.H. et al. (2023) *Molecular Plant Pathology* 24(5): 474-494.
 Iida Y., et al. (2015) *PLOS ONE* 10(4): e0123271.
 Mesarich C.H. et al. (2018) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31(1): 145-162.
 Iida Y., et al. (2018) *Plant Pathology* 67: 1883-1890.
 Zuccaron, A.Z. et al. (2022) *Microbial Genomics* 8(4) 000819.
 Sushida, H., et al. (2019) *Microbiology Resource Announcements* 8(35) 00655-19.
 Karimi-Jashni, M., et al. (2022) *Frontiers in Microbiology* 13: 919809.
 de la Rosa, S., et al. (2024) *New Phytologist* (Online ahead of print).
 van Kan J.A.L., et al. (1991) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 52-59.
 Tirilly, Y., et al. (1983) *Phytochemistry* 22: 2082-2083.
 Maeda, K., et al. (2024) *bioRxiv* 2024.03.22.586281.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Yoshida Kandai, Asano Shunsuke, Sushida Hirotooshi, Iida Yuichiro	4. 巻 87
2. 論文標題 Occurrence of tomato leaf mold caused by novel race 2.4.9 of <i>Cladosporium fulvum</i> in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-020-00963-x	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 Karimi-Jashni Mansoor, Maeda Kazuya, Yazdanpanah Farzaneh, de Wit Pierre J. G. M., Iida Yuichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 An Integrated Omics Approach Uncovers the Novel Effector Ecp20-2 Required for Full Virulence of <i>Cladosporium fulvum</i> on Tomato	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 919809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.919809	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 de la Rosa Silvia, Schol Christiaan R., Ramos Peregrina Angeles, Winter David J., Hilgers Anne M., Maeda Kazuya, Iida Yuichiro, Tarallo Mariana, Jia Ruifang, Beenen Henriek G., Rocafort Mercedes, de Wit Pierre J. G. M., Bowen Joanna K., Bradshaw Rosie E., Joosten Matthieu H. A. J., Bai Yuling, Mesarich Carl H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sequential breakdown of the <i>Cf-9</i> leaf mould resistance locus in tomato by <i>Fulvia fulva</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 New Phytologist	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) 10.1111/nph.19925	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 Maeda Kazuya, Sumita Takuya, Nishi Oumi, Sushida Hirotooshi, Higashi Yumiko, Nakagawa Hiroyuki, Suzuki Tomoko, Iwao Eishin, Fanani Much Zaenal, Nishiya Yoshiaki, Iida Yuichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Adaptive evolution of sesquiterpene deoxyphenone in mycoparasitism by <i>Hansfordia pulvinata</i> associated with horizontal gene transfer from <i>Aspergillus</i> species	5. 発行年 2024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) 10.1101/2024.03.22.586281	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 須志田浩稔、前田和弥、幸田真梨子、Much Zaenal Fanani、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌Dicyma pulvinataのゲノムおよびトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田祐一郎、前田和弥、Much Zaenal Fanani
2. 発表標題 カビを利用してカビを抑える –病原菌と寄生菌の戦い–
3. 学会等名 日本防菌防黴学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住田卓也、須志田浩稔、東佑実子、中川博之、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌Dicyma pulvinataと麹菌Aspergillus oryzaeが分泌するセスキテルペンdeoxyphomenoneの機能
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田和弥、住田卓也、須志田浩稔、中川博之、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌Dicyma pulvinataと麹菌Aspergillus oryzaeが分泌する抗菌性物質deoxyphomenoneの胞子形成における役割
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田和弥、住田卓也、中川博之、Much Zaenal Fanani、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌と麹菌が分泌するセスキテルペンdeoxyphomenoneの機能解析
3. 学会等名 第31回イソプレノイド研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田和弥、住田卓也、中川博之、Much Zaenal Fanani、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌Dicyma pulvinataとAspergillus 属が分泌するdeoxyphomenoneの機能解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田和弥、西矢芳昭、飯田祐一郎
2. 発表標題 食料クライシスを防ぐ！ カビを食べるカビによる植物保護のメカニズム
3. 学会等名 第7回融合科学研究所講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田祐一郎
2. 発表標題 Friend or foe? : The battle between "good and bad" fungi in the rhizosphere
3. 学会等名 International symposium on sustainable crop production and biosciences (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田和弥、住田卓也、須志田浩稔、中川博之、Much Zaenal Fanani、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌 <i>Dicyma pulvinata</i> が分泌する deoxyphomenone の生合成遺伝子群は菌寄生時に高発現する
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 C.R. Schol, S. de la Rosa, R. Peregrina, D.J. Winter, 前田和弥, 飯田祐一郎, M. Tarallo, R. Jia, H.G. Beenen, P.J.G.M. de Wit, J.K. Bowen, R.E. Bradshaw, M.H.A.J. Joosten, Y. Bai, C.H. Mesarich
2. 発表標題 Re-emergence of a pathogen: sequential breakdown of Cf-9, the most commonly deployed leaf mould resistance locus in commercially cultivated tomato by <i>Fulvia fulva</i> (syn. <i>Cladosporium fulvum</i>)
3. 学会等名 12th International congress on plant pathology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 巖瑛心、前田和弥、住田卓也、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌 <i>Hansfordia pulvinata</i> の菌寄生性における光応答
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小原麻衣、前田和弥、幸田真梨子、住田卓也、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌 <i>Hansfordia pulvinata</i> の Nep1 様タンパク質の機能解析
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 前田和弥、須志田浩稔、住田卓也、飯田祐一郎
2. 発表標題 菌寄生菌Hansfordia pulvinataのトマト葉かび病菌寄生時における発現変動遺伝子の解析
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024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
研究分担者	中川 博之 (Nakagawa Hiroyuki) (30308192)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・上級研究員 (82111)	
研究分担者	須志田 浩稔 (Sushida Hirotoshi) (10885510)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・研究員 (82111)	

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			
ニュージーランド	Massey University			
オランダ	Wageningen University			