

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05967

研究課題名(和文)デュアル抵抗性蛋白質をコアとした複数の受容体による炭疽病菌認識システムの解明

研究課題名(英文) Analysis of Colletotrichum fungi recognition systems consisting of dual resistance protein

研究代表者

鳴坂 義弘 (Narusaka, Yoshihiro)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：20335459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は病原体の攻撃に対して、病原体が分泌する非病原性因子(AVRエフェクター)を抵抗性(R)タンパク質により認識し、病原体に対する抵抗性を発揮している。研究代表者は、モデル実験植物シロイヌナズナのゲノム上に病原糸状菌のアブラナ科野菜類炭疽病菌に対する抵抗性(R-)遺伝子として、5番染色体に座するデュアルR-遺伝子RPS4/RRS1と4番染色体に座するRCH1の2セットが存在することを新たに明らかにした。これらはそれぞれ単独で機能し、どちらかを有することで炭疽病菌に対する抵抗性を示した。本研究により発見したRCH1は既存のドメインを有しておらず、新規なRタンパク質であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロイヌナズナは世界で最も研究が進んだモデル植物であり、多種多様なリソースと豊富な技術、情報が蓄積されている。このためシロイヌナズナを活用すれば、有用遺伝子の探索と機能解明を迅速に進めることができる。そしてその成果をゲノム編集技術などを介して産業植物に適用することにより、革新的な農業技術の開発につながる可能性がある。そこで研究代表者は、作物に重篤な病害を引き起こす炭疽病菌に対する防御機構を解明するため、シロイヌナズナを対象とした分子レベルの研究を進めてきた。本研究により、宿主植物-病原体間の適応共進化を分子レベルで解明し、世界中で猛威を振るう炭疽病に対する抵抗性作物の創製に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Plants recognize pathogen attacks by AVR effectors secreted by pathogens through resistance (R) proteins. Recently, we identified two sets of resistance (R-) genes within the genome of *Arabidopsis thaliana*, which trigger defense responses against the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. These genes consist of RPS4/RRS1, a dual R-gene locus situated on chromosome 5, and RCH1 located on chromosome 4. Each of these proteins independently confers resistance to anthracnose. On the other hand, the RCH1 protein discovered in this study lacks the typical domain structure found in known R proteins. Future research characterizing RCH1 may provide further insight into disease control strategies against anthracnose.

研究分野：植物免疫学

キーワード：抵抗性タンパク質 抵抗性遺伝子 Rタンパク質 R-遺伝子 AVRエフェクター アブラナ科野菜類炭疽病菌 シロイヌナズナ 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナは世界で最も研究が進んだモデル植物であり、多種多様なリソースと豊富な技術、情報が蓄積されている。このためシロイヌナズナを活用すれば、有用遺伝子の探索と機能解明を迅速に進めることができる。そしてその成果をゲノム編集技術などを介して産業植物に適用することにより、革新的な農業技術の開発につなげることが可能である。そこで研究代表者は、作物に重篤な病害を引き起こす炭疽病菌に対する防御機構を解明するため、シロイヌナズナを対象とした分子レベルの研究を進めてきた。

Flor 博士(1956年)が提唱した有名な遺伝子対遺伝子説では、植物の病原体に対する抵抗反応の誘導が、病原体の持つ非病原力遺伝子(AVRエフェクター)と植物の抵抗性遺伝子(R蛋白質; 病原体を認識する植物側の受容体)の1対1の組み合わせによって決定される。しかし、例えばシロイヌナズナのゲノム上には約150のR蛋白質しか存在せず、多様な病原体に対する抵抗性はどのようなメカニズムによって発揮されているのか、遺伝子対遺伝子説のみでは説明できなかった。

研究代表者は、宿主植物のシロイヌナズナのゲノム上(5番染色体)で隣接する異なる2つのR遺伝子(RPS4とRRS1)がペアでR蛋白質複合体を形成し、アブラナ科野菜類炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*, 以下、アブラナ炭疽病菌と略す)のみならず複数の病原体(アブラナ炭疽病菌、ウリ類炭疽病菌、斑葉細菌病菌、青枯病菌、黒腐病菌)の攻撃を認識して抵抗反応を起動する“デュアルR蛋白質システム”を世界に先駆けて発見した(Narusaka et al. 2009, 引用数438件)(図1)。さらに、R遺伝子ペアRPS4/RRS1を導入した作物(キュウリ、トマト、コマツナ)は上述の複数の病原菌に対して科を超えて抵抗性を示すようになることを明らかにし、R遺伝子は科を超えて機能しないという定説を覆した。この成果は、遺伝子対遺伝子説、ガード説に加えて、植物による第3の病原体認識システム「decoy(おとり)モデル」として国際的に評価されている。研究代表者は、炭疽病菌に対する宿主植物の抵抗性機構について鋭意研究を進めた結果、宿主植物シロイヌナズナのゲノム上には、新たなR遺伝子座RCH1(Recognition of *C. higginsianum*)が4番染色体上腕に座乗することを独自に発見した。興味深いことに、R遺伝子ペアRPS4/RRS1およびRCH1の両R蛋白質受容体を有するシロイヌナズナ生態型Eil-0は、1セットしかもたない生態型に比べて強力な抵抗性を示した。1つの病原体に対して複数のR蛋白質がどのように抵抗性に関わっているのかを明らかにすることで、宿主植物-病原体間の適応共進化の研究に新たな知見を提供する。

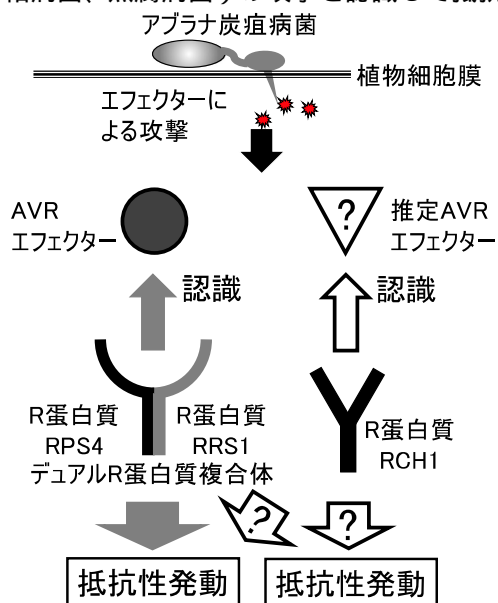


図1. R蛋白質によるAVRエフェクターの認識と抵抗性発動の概略図

2. 研究の目的

研究代表者の独自の研究により、アブラナ炭疽病菌に対するシロイヌナズナのR遺伝子は5番染色体のRPS4/RRS1に加えて、4番染色体上腕にもR遺伝子座RCH1の存在が明らかとなったが、これらが互いにどのように関わり合ってアブラナ炭疽病菌を認識して抵抗性を発揮しているのかは全く明らかにされていない。本研究の目的は、これらR蛋白質の病原体に対する抵抗性発動に関する役割および貢献度を解明し、宿主植物のゲノム上に炭疽病菌に対する複数のR遺伝子座が存在することの意義や、宿主植物-病原体間の適応共進化を分子レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

研究代表者は、アブラナ炭疽病菌に対する抵抗反応がシロイヌナズナ生態型によって異なることに着目し、生態型間のマップベースクローニングにより、アブラナ炭疽病菌を認識する推定R遺伝子座RCH1が新たに存在することを明らかにした。興味深

表1. 炭疽病に対する感受度とR蛋白質の関係

シロイヌナズナ生態型	炭疽病に対する感受度	R蛋白質	
		RPS4/RRS1	RCH1
Col-0, Ler-0	感受性	欠損	欠損
Ws-2	抵抗性		欠損
Eil-0	強い抵抗性		
A-0	抵抗性	欠損	

いことに、2セットのR蛋白質受容体を有する生態型 Eil-0 は、1セットしかもたない生態型に比べて強力な抵抗性を示した(表1)。本作用機作の作業仮説として、それぞれのR蛋白質受容体が異なる AVR エフェクターを認識し、それぞれ独立した防御シグナル伝達系により炭疽病菌に対する抵抗性を発揮することを意味している(図1)。本作業仮説を証明するため、研究代表者は R 遺伝子座 *RCH1* のみを有するシロイヌナズナ生態型 A-0(仮称)を発見し、A-0の全ゲノムの解読および、RNAseq 解析による推定転写産物を特定した。具体的には、不活性型の RRS1-S と活性型の *RCH1* を有しアブラナ炭疽病菌に抵抗性を示すシロイヌナズナ生態型 A-0 および、不活性型の RRS1-S と *RCH1*-S を有しアブラナ炭疽病菌に感受性を示す *Ler*-0 を用いて、*RCH1* 遺伝子座の特定を試みた。最初に、A-0 と *Ler*-0 を交配して得られた F2 個体(約 6000 個体)からアブラナ炭疽病菌に感受性を示す 1489 個体を選抜した。次いで、TAIR の 4 番染色体におけるマッピングマーカーにより、目的遺伝子がマーカー間に存在することが示唆された。さらに、A-0 および *Ler*-0 間のマッピングマーカーを作製するため、次世代シーケンス解析により、A-0 の全ゲノム解析を行った。目的領域を *Ler*-0 ゲノム配列と比較解析した結果、9 種の SSLP マーカーとリアルタイム PCR を用いた 10 種の HRM マーカーが作製できた。また、全ゲノムシーケンスで得られた A-0 の目的領域には 11 のコンティグが存在した。そこで、コンティグ間の配列を特定するため、10kb 以上の塩基配列を増幅可能な KOD One PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて増幅し、コンティグ間の未知配列を決定した。その結果、A-0 の 4 番染色体上腕にアブラナ炭疽病菌を認識する抵抗性遺伝子 *RCH1* が存在することをつきとめた。

さらに、*RCH1* を特定するため、A-0 のゲノムにランダムな変異を導入し、アブラナ炭疽病菌に対して感受性変異体の獲得を試みた。A-0 種子に 0.5%EMS を用いて 4 時間の変異原処理を行い、M2 種子を得た。M2 種子約 30,000 個体からアブラナ炭疽病菌に感受性を示す個体を選抜した結果、59 個体の感受性変異体候補が得られた。感染個体を洗浄および感染葉を削除し、個体の維持ができたものの中には不稔性を示す個体も多く認められた。このうち次世代種子が得られた 16 ラインについてアブラナ炭疽病菌を接種する 2 次選抜を行った結果、感受性ホモラインが 4 ライン得られた。また、病原菌接種により葉が黄化する形態を示すラインが 2 ライン得られた。現在、感受性ライン(S23, S49 および S50)について A-0 と交配し、次世代種子の取得を行っている。今後、得られた次世代種子にアブラナ炭疽病菌を接種し、感受性を示す個体からゲノム DNA を調製し、次世代シーケンサーを用いて変異位置の特定を試みる。現在、感受性個体を得て、戻し交雑を行っている。また、アブラナ炭疽病菌に強い抵抗性を示す Eil-0 についても種子に 0.5%EMS を用いて 4 時間の変異原処理を行い、M2 種子を得た。アブラナ炭疽病菌に感受性を示す個体を選抜した結果、数個体の感受性変異体候補が得られた。次いで、感受性個体から原因となる遺伝子変異の同定を試みた。

4. 研究成果

研究代表者は、定説である遺伝子対遺伝子説では説明できない事例を独自に発見した。研究代表者が発見した R 遺伝子 *RPS4/RRS1* がペアとなり、R 蛋白質複合体を形成して機能する“デュアル R 蛋白質システム”は、遺伝子対遺伝子説、ガード説に次ぐ第 3 の病原体認識システム「decoy (おとり) モデル」として国際的に評価されている。近年、本学術分野では、病原体が攻撃する宿主植物の標的蛋白質(おとり)と受容蛋白質(R 蛋白質)が一对となって病原体を認識し抵抗性を発揮するとの考えが主流になりつつある。特に、R 蛋白質ペア *RPS4/RRS1* は、RRS1 の C 末端側に WRKY モチーフを有した特徴的な構造を有しており、病原体の標的蛋白質であると予想されている。

本研究では、*RPS4/RRS1* に加えて、4 番染色体に座乗する *RCH1* の同定を試みた。不活性型の RRS1-S と *RCH1*-S を有しアブラナ炭疽病菌に感受性を示すシロイヌナズナ生態型 *Ler*-0 を用いて、*RCH1* 遺伝子座の特定を試みた。本菌に抵抗性を示す A-0 と *Ler*-0 を交配して得られた F2 個体を用いてマッピングした結果、A-0 の 4 番染色体上腕にアブラナ炭疽病菌を認識する抵抗性遺伝子座 *RCH1* が存在することをつきとめた。さらに RNAseq 解析により、本領域内に複数の転写産物が存在することが示唆され、*RCH1* 候補領域の推定に成功した。

各種シロイヌナズナ生態型の解析の結果、*RPS4/RRS1* と *RCH1* はそれぞれ単独で機能し、どちらかを有することで炭疽病菌に対する抵抗性を示した。近年、多くの植物の R 蛋白質の構造が解析された結果、一般的な R 蛋白質は、核酸結合部位(NB: Nucleotide Binding site)とロイシンの繰り返し配列をもつ部位(LRR: Leucine-Rich Repeats)から構成されていることが明らかになった(NB-LRR 型受容体という)。本研究により推定される *RCH1* 候補は NB-LRR ドメインを有しておらず、新たな R 蛋白質であると考えられる。

また、アブラナ炭疽病菌に対する抵抗性発現における R 蛋白質 *RCH1* の役割、機能および貢献度を解明するため、*RCH1* の破壊植物の作製を試みた。アブラナ炭疽病菌に抵抗性のシロイヌナズナ生態型に変異原処理し、本菌に対して感受性になった複数の変異体を選抜した。感受性 1 ラインについて、戻し交雑 1 世代目の感受性個体を用いて、次世代シーケンサーによる原因遺伝子の特定を試みた結果、1 つの Eil-0 感受性変異体は *ACD1*(*accelerated cell death 1*) 遺伝子に変異が認められ、炭疽病菌に対する防御シグナル伝達に *ACD1* が関与していることが明らかになった。本防御機構に *ACD1* が関与していることは新たな知見である。

本研究により、*RCH1* は新規の構造を有する R 蛋白質であることが示唆された。以上の通り、定説とは異なる新たな知見を得ており、本研究により宿主植物-病原体間の適応共進化を明らかに

し、炭疽病に対する複数の R 蛋白質を用いることで、抵抗性作物の創製へ応用できる。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Narusaka Mari、Narusaka Yoshihiro	4. 巻 47
2. 論文標題 How can biostimulants make a contribution to plant protection?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 69～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.W22-21	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 Gan Pamela、Hiroshima 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsushima Ayako、Narusaka Mari、Gan Pamela、Kumakura Naoyoshi、Hiroshima 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 鳴坂真理、鳴坂義弘	4. 巻 4(8)
2. 論文標題 デュアル抵抗性タンパク質システムによる革新的作物保護技術の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 55～57
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 -

1. 著者名 Inoue Yoshihiro, Phuong Vy Trinh Thi, Singkaravanit Ogawa Suthitar, Zhang Ru, Yamada Kohji, Ogawa Taiki, Ishizuka Junya, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka	4. 巻 238
2. 論文標題 Selective deployment of virulence effectors correlates with host specificity in a fungal plant pathogen	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1578 ~ 1592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.18790	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

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本田一馬、鳴坂義弘、鳴坂真理
2. 発表標題 腐植酸処理した植物における病害防御応答機構の解明
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡美樹、荒川花子、鳴坂真理、鳴坂義弘、山口賢人、北川隆啓、吉岡博文
2. 発表標題 植物免疫ホルモンモニター植物による抵抗性誘導剤を内包したナノ粒子剤の評価
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 2022年

1. 発表者名 鳴坂義弘、飛永恭兵、山口賢人、北川隆啓、齊藤太香雄、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂真理
2. 発表標題 ナノ粒子を用いた新規抵抗性誘導剤の開発
3. 学会等名 令和3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 吉岡美樹、荒川花子、西内沙希、鳴坂義弘、鳴坂真理、北川隆啓、斉藤太香雄、安達広明、吉岡博文
2. 発表標題 病原菌に応答したベンサミアナタバコにおけるSAおよびJAシグナルの時空間的動態
3. 学会等名 令和3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 鳴坂真理、鳴坂義弘
2. 発表標題 バイオスティミュラントはどのように植物保護に貢献できるか？
3. 学会等名 日本農薬学会第47回大会
4. 発表年 2022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 2022年

1. 発表者名 安達凜奈、宇津木一陽、鳴坂真理、鳴坂義弘、刑部敬史、刑部祐里子
2. 発表標題 トマト葉緑体シグマ因子相互作用タンパク質SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1のゲノム編集技術による改変と機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴坂義弘
2. 発表標題 環境にやさしい革新的病害防除法の開発
3. 学会等名 「知」の集積と活用の場 産学官連携協議会 令和2年度ポスターセッション オンライン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳴坂真理、高野義孝、谷口伸治、藤澤英司、野口勝憲、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂義弘
2. 発表標題 新規植物活力剤バイオスティミュラントの開発研究
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 優介、吉岡美樹、日野雄太、安達広明、高野義孝、別役重之、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文
2. 発表標題 半活物寄生菌や殺生菌を接種したベンサミアナタバコにおけるSA・JAシグナルの時空間的な活性動態
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳴坂義弘、鳴坂真理ら
2. 発表標題 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォームの紹介
3. 学会等名 農林水産省「知」の集積と活用の場 産学官連携協議会ポスターセッション2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳴坂義弘、鳴坂真理ら
2. 発表標題 出展 植物の活性化による革新的農産物生産技術研究開発プラットフォーム
3. 学会等名 アグリビジネス創出フェア2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳴坂真理、鳴坂義弘
2. 発表標題 デュアル抵抗性タンパク質システムを活用した病害抵抗性作物の分子育種技術の開発研究
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊倉直祐、Suthitar Singkaravanit-Ogawa、Pamela Gan、津島綾子、石濱伸明、渡邊俊介、瀬尾光範、岩崎信太郎、鳴坂真理、鳴坂義弘、高野義孝、白須賢
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6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林 優介、吉岡美樹、日野雄太、安達広明、高野義孝、別役重之、鳴坂真理、鳴坂義弘、吉岡博文
2. 発表標題 病原菌感染および傷害や食害に応答したベンサミアナタバコでのSA/JAシグナルの時空間的な活性動態
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1件

1. 著者名 鳴坂義弘、鳴坂真理 (山内 靖雄、須藤 修、和田 哲夫 監修) 日本バイオスティミュラント協議会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 バイオスティミュラントハンドブック	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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