

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15529

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の細胞壁糖鎖修飾を介したストレス応答の解析

研究課題名（英文）Analysis of stress responses mediated by cell wall glycosylation in fungal plant pathogen

研究代表者

小玉 紗代（KODAMA, Sayo）

摂南大学・農学部・助教

研究者番号：10824039

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：植物病原糸状菌の細胞壁は細胞保護や形態維持の役割だけでなく形態形成の制御や環境ストレスの感知に重要な役割を果たす。本研究ではウリ科植物に感染する炭疽病菌のタンパク質糖鎖修飾関連因子CoPap2が細胞壁成分の構成および病原性に重要であり脂質脱リン酸化酵素として小胞体における糖鎖修飾に寄与することを明らかにした。また細胞壁ストレスセンサーは細胞壁完全性および病原性に必要であること、MAPキナーゼMaf1活性は細胞壁ストレス応答性を示しその活性はCoPap2の影響を受けたことから、CoPap2を介した糖鎖修飾とCell Wall Integrity経路を介した細胞壁ストレス応答との関連性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに植物病原糸状菌の感染時には細胞壁構造の大幅な再構築が起こることがわかってきた。細胞壁に含まれる多糖類や糖タンパク質の多くは糖鎖修飾を受けるとされているが、植物病原糸状菌の細胞壁合成および再構成機構の感染制御における役割はよく知られていない。本研究では、植物病原糸状菌の病原性に必要な脂質脱リン酸化酵素が細胞壁成分の糖鎖修飾に寄与することを見出し、さらにCWI経路を介した細胞壁ストレス応答に関与することを明らかにした。本研究により植物病原糸状菌の感染過程における細胞壁再構成に関する新たな知見を提供し、より効果的な植物糸状菌病防除薬剤や抗真菌薬の標的探索に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The cell walls of phytopathogenic fungi play important roles in morphogenesis and environmental stress response, as well as in cell protection and integrity maintenance. In this study, we showed that a dolichylidiphosphatase CoPap2 of cucumber anthracnose fungus is required for fungal cell wall integrity and pathogenicity and contributes to glycosylation in the ER. We also found that a cell wall stress sensor is required for cell wall integrity and pathogenicity, and that the MAP kinase Maf1 activity is cell wall stress-responsive and that its activity is affected by CoPap2. Our results revealed a link between CoPap2-mediated glycosylation and CWI pathway-mediated cell wall stress response.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原糸状菌 ウリ類炭疽病菌 病原性 細胞壁 ストレス応答 糖鎖修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病原糸状菌の細胞壁は細胞形態を維持するだけでなく、菌と宿主植物の境界面として形態形成に必要な環境シグナル認識や環境ストレスに対する応答にも寄与する。近年、感染時には細胞壁構成が大幅に変化することがわかってきた。細胞壁に含まれる多糖類や糖タンパク質の多くは糖鎖修飾を受けるとされているが、細胞壁の詳細な構造やその合成および再構成機構の感染制御における役割はよく知られていない。

本研究では、ウリ科植物に感染する炭疽病菌の病原性に必要な推定タンパク質糖鎖修飾関連因子 CoPap2 が細胞壁ストレス応答に関与するという観察に基づき、糖鎖修飾機構および感染時の細胞壁ストレス応答と病原性との関係性を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、ウリ類炭疽病菌のタンパク質糖鎖修飾機構および感染時の細胞壁ストレス応答と病原性との関係性を明らかにすることを目的とする。そのために、CoPap2 が細胞壁糖鎖修飾に与える影響、細胞壁ストレスセンサーを含む Cell Wall Integrity シグナル経路の機能、CoPap2 を介した糖鎖修飾が細胞壁ストレス応答に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖修飾関連因子 CoPap2 が細胞壁糖鎖修飾に関与するメカニズムの解明

CoPap2 は脂質リン酸結合モチーフおよび膜貫通ドメインを持ち、小胞体におけるタンパク質の糖鎖修飾に必要な脱リン酸化酵素として機能すると考えられる。そこで、CoPap2 が細胞壁糖鎖修飾に与える影響を評価するため、まず糸状菌の細胞壁成分と結合し糖鎖上の N-アセチル-D-グルコサミンおよびシアル酸残基に対する高い親和性を持つコムギ胚芽凝集素 (WGA) 蛍光標識を用いて、細胞壁構造を観察し CoPap2 が細胞壁構成に関与するかどうか検証した。次に、CoPap2 が脂質脱リン酸化酵素として機能する可能性を検討するため、脂質リン酸結合モチーフをアミノ酸点変異させ CoPap2 が機能欠損となるか検討した。さらに、蛍光タンパク質付加により CoPap2 と糖鎖修飾が行われる小胞体の細胞局在性を検討し、CoPap2 が小胞体で機能するかどうか評価した。

(2) Cell Wall Integrity シグナル伝達経路と細胞壁ストレス応答との関与の検証

出芽酵母では細胞壁損傷をストレスセンサーが感知し、下流シグナル伝達経路を活性化させ細胞壁合成酵素や糖タンパク質を発現誘導させる。ウリ類炭疽病菌の CWI 経路が細胞壁ストレス応答に寄与するのか検証するため、ストレスセンサーおよび細胞壁構成成分である WSC 遺伝子を同定し、その遺伝子破壊が細胞壁完全性および病原性に与える影響を評価した。さらに、蛍光タンパク質付加により WSC タンパク質がどこで機能するのか細胞局在性から評価した。また、CWI シグナル伝達経路因子ホモログであり、ウリ類炭疽病菌の感染器官形成および病原性に関与する MAP キナーゼ Maf1 の活性が細胞壁ストレスの影響を受けるのかどうかウェスタンブロットにより評価した。

(3) CoPap2 を介した糖鎖修飾の細胞壁ストレス応答および病原性への関与の検証

CoPap2 を介した糖鎖修飾がどのように細胞壁ストレス応答および病原性に影響するのか解明するため、*copap2* 破壊株での WSC 局在性から CoPap2 が WSC の機能に影響を与えるか検証した。さらに、Maf1 キナーゼ活性を野生株と *copap2* 破壊株で比較し、CoPap2 を介した糖鎖修飾が CWI シグナル伝達経路に与える影響を検討した。また、野生株および *copap2* 破壊株の糖タンパク質の抽出分離実験により細胞壁ストレス条件下での糖タンパク質比較解析を試みた。

4. 研究成果

(1) 糖鎖修飾関連因子 CoPap2 が細胞壁糖鎖修飾に関与するメカニズムの解明

糸状菌細胞壁成分の N-アセチル-D-グルコサミンおよびシアル酸残基に対する高い親和性を持つコムギ胚芽凝集素 (WGA) 蛍光標識を用いてウリ類炭疽病菌の細胞壁構造を観察した結果、野生株の分生孢子と比較して *copap2* 遺伝子破壊株では WGA 蛍光の減少が見られた。このことから CoPap2 が細胞壁成分キチンの糖鎖構成に寄与する可能性を示した。次に、CoPap2 に保存され

ている脂質リン酸結合モチーフのアミノ酸点変異 (R78A, H93A) 導入により、本菌の病斑形成が減少したことから、本モチーフの重要性と CoPap2 が脂質脱リン酸化酵素として機能することを明らかにした。また、蛍光タンパク質付加により CoPap2 と糖鎖修飾の場である小胞体膜を可視化した。小胞体に局在するカルレティキュリンのシグナルペプチド (SP)、GFP および小胞体残留シグナル (HDEL) を融合させ、ウリ類炭疽病菌に導入した結果、安定した小胞体の可視化に成功し、さらに CoPap2-mCherry が菌糸生育時および感染器官形成時に小胞体膜で機能することを明らかにした。

(2) Cell Wall Integrity シグナル伝達経路と細胞壁ストレス応答との関与の検証

細胞壁ストレスセンサーのホモログ遺伝子 *CoWSC1*, *CoWSC2* および *copap2* 破壊株を用いた植物感染時のトランスクリプトーム解析により新たに同定した CoPap2 制御下にある細胞壁構成成分 *CoWSC3*, *CoWSC4*, *CoWSC5*, *CoWSC6* の遺伝子破壊株の作出に成功した。病原性および細胞壁ストレス耐性を評価した結果、*cowsc1* 破壊株は病原性低下および細胞壁ストレス感受性を示し、本菌の細胞壁完全性および病原性には *CoWSC1* が重要であることを見出した。一方 *CoWSC2-6* は単独破壊株および多重破壊株共に野生株と同様の病原性を保持しており、細胞壁構成因子の機能重複性が示唆された。次に、蛍光タンパク質付加により WSC タンパク質の細胞内局在性を評価した結果、CoWsc1-GFP, CoWsc3-GFP は細胞膜・細胞壁周辺に局在を示し、これらの機能部位が明らかになった。さらに、出芽酵母 CWI 経路因子 MAP キナーゼ Mpk1 のホモログであるウリ類炭疽病菌 MAP キナーゼ Maf1 の活性が細胞壁ストレスの影響を受けるのかどうかリン酸化特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。その結果、細胞壁結合性カルコフルオールホワイトの添加培養時に非添加区と比較して Maf1 活性は上昇した。このことから、Maf1 は本菌の CWI 経路の構成因子として細胞壁ストレス応答に寄与している可能性を見出した。

(3) CoPap2 を介した糖鎖修飾の細胞壁ストレス応答および病原性への関与の検証

蛍光タンパク質付加により可視化した CoWsc3-GFP の野生株および *copap2* 破壊株における局在を植物感染時において比較観察した結果、*copap2* 破壊株では野生株と比較して CoWsc3-GFP 蛍光が見られなくなったことから CoPap2 が細胞壁成分 CoWsc3 の機能に影響することが示された。推定細胞壁ストレスセンサー CoWsc1-GFP についても観察を行っており、CoPap2 と細胞壁ストレス応答との関連性の検証を進めている。さらに、Maf1 活性の評価により CWI 経路と CoPap2 との関連性を評価した結果、野生株では細胞壁ストレス存在時に Maf1 活性が上昇した一方で、*copap2* 破壊株では細胞壁ストレスの存在に関わらず野生株と比較して Maf1 活性は減少していた。このことから、CoPap2 を介した糖鎖修飾と CWI 経路を介した細胞壁ストレス応答との連関が示唆された。また、カルコフルオールホワイト添加時および非添加時の野生株および *copap2* 破壊株の菌糸から糖タンパク質の抽出実験を実施した。これまでのところ、比較解析に十分な抽出糖タンパク質の取得には至っておらず実験を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Kodama Sayo, Kajikawa Naoki, Fukada Fumi, Kubo Yasuyuki	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.02236-22	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 Bissaro Bastien, Kodama Sayo, Nishiuchi Takumi, 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, 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 Kodama Sayo, Bissaro Bastien, Berrin Jean-Guy, Kubo Yasuyuki	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 101979 ~ 101979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pmp.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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sayo Kodama, Bastien Bissaro, Takumi Nishiuchi, Hayat Hage, David Ribeaucourt, Mireille Haon, Sacha Grisel, A. Jalila Simaan, Fred Beisson, Stephanie M. Forget, Harry Brumer, Marie-Noelle Rosso, Richard O'Connell, Michael Lafond, Yasuyuki Kubo, Jean-Guy Berrin
2. 発表標題 Contribution of the aliphatic alcohol oxidase CorAlcOx and the peroxidase CorPerOx to pathogenicity of <i>Colletotrichum orbiculare</i>
3. 学会等名 IPSR International Plant Web Forum 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	小玉紗代, Bastien Bissaro, 西内巧, Hayat Hage, David Ribeaucourt, Mireille Haon, Sacha Grisel, A. Jalila Simaan, Fred Beisson, Stephanie M. Forget, Harry Brumer, Marie-Noelle Rosso, Richard O'Connell, Michael Lafond, 久保康之, Jean-Guy Berrin
2. 発表標題	ウリ類炭疽病菌の脂肪族アルコールオキシダーゼCorAlcOxとペルオキシダーゼCorPerOxの付着器侵入への寄与
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	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	令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	小玉紗代, 梶河直起, 深田史美, 久保康之
2. 発表標題	ウリ類炭疽病菌の細胞内ステロール輸送機構は膜湾曲と付着器侵入に必要である
3. 学会等名	第21回 糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年	2022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 Colletotrichum orbiculare: sterol transport and appressorium-mediated plant infection
3. 学会等名	16th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年	2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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