

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：23303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850029

研究課題名(和文)病原糸状菌エフェクターが起動する植物免疫スイッチの解析

研究課題名(英文)Analysis of the regulation of plant immune responses operated by fungal effectors.

研究代表者

高原 浩之(TAKAHARA, Hiroyuki)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：30397898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：

アブラナ科植物炭疽病菌は、宿主細胞へ侵入する際にエフェクタータンパク質を分泌する。本研究では、炭疽病菌エフェクター候補の中から、植物の防御応答の指標として挙げられる細胞死を抑制する2種類の因子を同定した。その一方で、植物の細胞死を引き起こす新規の分泌タンパク因子も見出した。これらは、他のいくつかの植物病原糸状菌ゲノムにも存在していたことから、Colletotrichum属を超えて共通の機能をもつエフェクターではないかと推察した。

研究成果の概要(英文)：

The crucifer anthracnose fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* secretes effector proteins during host infection. In this study, we identified the two effector candidates, which they may suppress plant cell death as one of indicator of plant immune responses. On the other hand, we also identified a novel secreted protein which induces plant cell death. The putative homologs of these effector candidates were presented in several fungal genomes, indicating that functional homologs will be distributed in several plant fungal pathogens.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 エフェクター 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

植物は、動物のような免疫機構を持たない代わりに、特有の抵抗反応を発揮することで、病原微生物などの外敵から身を守っている。植物の表層には、PAMPs として総称される微生物が持つ特徴的な分子パターンを認識する受容体が存在し、それらを介して外敵シグナルを細胞内に伝達することで抵抗性が誘導されることが、近年明らかとなってきた。しかしながら、植物にはそのような抵抗性機構（植物免疫）が備わっているにもかかわらず、病原体はその植物免疫を巧みにかいくぐり感染へと至る。「植物病原体は、どのようにして植物が本来発揮する免疫反応から逃れ、寄生を確立するのか？」という課題は、植物病理・植物保護分野の発展において、大変重要な課題である。

このような背景の中、近年、植物病原菌の感染に必須な病原性因子として、エフェクターが注目されている。エフェクターとは、病原体から分泌される物質のことで、それが宿主細胞に何らかの作用を発揮することで植物寄生に関与する重要な因子である。しかしながら、そのメカニズムについては不明な点が多い。我々は、これまでに植物病原系状菌のアブラナ科植物炭疽病とその宿主シロイヌナズナの相互作用研究から、分泌型のタンパク質をコードする遺伝子（エフェクター候補遺伝子）を同定してきた（Kleemann et al. 2012、O'Connell et al. 2012）。これらのエフェクター候補遺伝子は、宿主への感染の際に特異的に発現することから、本菌の病原性に深く関与することが予測されている。そこで、炭疽病菌エフェクターが宿主感染にどのように関与するのかを調べることで、植物の免疫反応の発動と抑制（ON と OFF）の制御機構が明らかになると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、アブラナ科植物炭疽病菌から分泌されるエフェクターが、植物への感染の際にどのような役割を果たしているのかを調べることで、病原系状菌による植物の免疫応答の発動と抑制（ON と OFF）を分子レベルで明らかにするものである。特

に、1)炭疽病菌エフェクターによる植物免疫の抑制機能、また、2)エフェクターを受容する植物側の因子については、ほとんど明らかになっていない。そこで、上記の2点を明らかにすることで植物の免疫発動の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 炭疽病菌エフェクターの一過的発現系の構築

タバコ実験植物 (*Nicotiana benthamiana*) にアグロバクテリウムを介してタンパク質を発現させるシステム (Agro-infiltration 法) を用いて、炭疽病菌エフェクターを植物体内で一過的に過剰発現させるシステムの構築を試みた。さらに、タバコ植物細胞に細胞死を誘導するタンパク質を発現させ、炭疽病菌エフェクターによる抑制効果を検証した。

(2) 炭疽病菌エフェクターの局在と機能解析

炭疽病菌エフェクターを植物体内で発現させる際に、植物細胞の内外に局在させ、どちらの場合に植物の免疫応答を抑制するのかを解析した。また、蛍光タンパク質融合型エフェクターを植物体内で発現させることで、細胞学的な側面からエフェクターの局在解析も同時に行った。

(3) 炭疽病菌エフェクターと相互作用する宿主因子の探索

酵母ツーハイブリッド法による炭疽病菌エフェクター結合タンパク質の探索を行った。Bait として炭疽病菌エフェクター 2 種類、Prey として宿主シロイヌナズナの cDNA ライブラリーを用いた。

4. 研究成果

本研究では、病原系状菌エフェクターによって調節される植物の免疫応答の発動と抑制（ON と OFF）の分子機構に迫る、以下の結果を得た。

(1) 炭疽病菌エフェクターによる植物免疫の発現制御

Agro-infiltration 法を用いて、炭疽病菌エフェクターを *Nicotiana benthamiana* 葉で一

過的に過剰発現させる実験系を構築した。そこで、タバコ葉に細胞死を誘導するタンパク質と炭疽病菌エフェクターを共発現させたところ、2つのエフェクターから細胞死抑制効果を見出した。また、その逆に、タバコ葉に防御応答を誘導する新規因子も同時に見出した。このことから、植物の免疫応答を、正および負に制御する炭疽病菌エフェクターを発見した。

(2) 炭疽病菌エフェクターの作用場所の特定

上記の炭疽病菌エフェクターを植物で発現させる際に、エフェクターのN末端部位にある分泌シグナルを欠損させたタンパク質を発現させたところ、それぞれの効果に違いが見られた。すなわち、植物の細胞内で働くエフェクターと細胞外で働くエフェクターが存在していた。以上のことから、炭疽病菌から分泌されるエフェクターは、植物の細胞外で作用するものと、植物細胞内に送り込まれて作用するものがあることが明らかとなった。

(3) 炭疽病菌エフェクターと相互作用する宿主因子

酵母ツーハイブリッド法による炭疽病菌エフェクター結合タンパク質の探索を行ったところ、複数の候補因子の同定に成功した。今後、これらの結合をより詳細に確認することで、疽病菌エフェクターを介した植物の免疫応答の分子機構が明らかになる。

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 1件)

Hayashi-Tsugane, M., Takahara, H., Ahmed, N., Himi, E., Takagi, K., Iida, S., Tsugane, K. and Maekawa, M. A mutable albino allele in rice reveals that formation of thylakoid membranes requires the SNOW-WHITE LEAF1 gene. *Plant Cell Physiol.* 55:3-15 (2014) 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pct149

[学会発表](計 13件)

高原浩之・岩井瑛理子・伊永結貴・山口将・湯本亮・三浦隆紀・Richard O'Connell. 炭疽病菌エフェクターの機能特性. 日本植物病理学会 100周年記念大会 2015.3.29-31 明治大学(東京)

植松繁・高原浩之・栗原孝行・藪哲男・古賀博則. レンコンネモグリセンチュウのレンコン若芽への侵入過程の光顕及び電顕観察. 第59回日本応用動物昆虫学会大会 2015.3.26-28 山形大学(山形)

外内濤・牧瀬福次郎・豎石秀明・西内巧・高原浩之. *Fusarium graminearum* の推定エポキシド加水分解酵素遺伝子の同定. 平成26年度日本植物病理学会関西支部会 2014.9.27-28 富山大学(富山)

岩井瑛理子・伊永結貴・湯本亮・三浦隆紀・高原浩之. アブラナ科植物炭疽病菌エフェクターによる植物細胞死誘導の抑制. 平成26年度日本植物病理学会関西支部会 2014.9.27-28 富山大学(富山)

山口将・高原浩之. アブラナ科植物炭疽病菌の分泌型細胞死誘導タンパク質. 平成26年度日本植物病理学会関西支部会 2014.9.27-28 富山大学(富山)

植松繁・高原浩之・栗原孝行・藪哲男・古賀博則. レンコン組織内に侵入したレンコンネモグリセンチュウ. 日本線虫学会第22回大会 2014.9.16-18 文部科学省研究交流センター(つくば)

古賀博則・柴田涼子・中村有希・岡崎博・高原浩之. ロシア国で収集したトールフェスクからの *Neotyphodium* エンドファイト菌の分離・培養と我が国の牧草への人工接種による感染. 日本菌学会第58回大会 2014.6.13-15 サイエンスヒルズこまつ(石川)

高原浩之・古賀博則・前川雅彦. トランスポゾン *nDart1* を利用したイネいもち病抵抗性コシヒカリの選抜. 平成26年度日

本植物病理学会 2014.6.2-4 札幌コンベンションセンター（北海道）

繁田春香・廣野皓亮・元女恭孝・古賀博則・前川雅彦・高原浩之. いもち病抵抗性を示すコシヒカリ-トランスポゾン挿入変異体の同定. 第 66 回北陸病害虫研究会 2014.2.13-14 アオッサ（福井県）

高原浩之・繁田春香・古賀博則・前川雅彦. 2013. いもち病抵抗性分子育種を目指したイネ DNA 型トランスポゾン挿入変異体の解析.平成 25 年度日本植物病理学会関西西部会 2013.9.26.-27 岡山大学（岡山）

高原浩之. 植物の防御機構をかいくぐる病原菌の感染戦略 第 29 回植物バイテクシンポジウム 2013.9.20. 京都府立大学（京都）

高原浩之・繁田春香・廣野皓亮・元女恭孝・古賀博則・前川雅彦. イネ内在性 DNA 型トランスポゾンを利用した病害抵抗性分子育種の試み. 日本植物病理学会平成 25 年度植物感染生理談話会 2013.8.19-21 粟津温泉 法師（石川）

宮下奈緒・中永里美・原田昂・林里紗・濱田亜矢子・安達直人・藪哲男・中野眞一・栗原孝行・高原浩之・古賀博則. 石川県のブランド作物における病害発生とその防除に向けた研究. 日本植物病理学会平成 25 年度植物感染生理談話会 2013.8.19-21 粟津温泉 法師（石川）

〔図書〕（計 1 件）

古賀博則・森 正之・田中栄爾・高原浩之(編). 日本植物病理学会 植物感染生理談話会論文集 第 48 号 2013. pp.143 .

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：カビ毒低減機能を有する植物の作成方法およびその利用

発明者：西内巧・浅野智哉・高原浩之

権利者：国立大学法人金沢大学・石川県公立

大学法人

種類：特許

番号：2014-012581

出願年月日：平成 26 年 1 月 27 日

国内外の別：日本国

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

石川県立大学 生物資源環境学部 生産科学科 植物病理学研究室

<http://www.ishikawa-pu.ac.jp/staff/?staffname=takahara-hiroyuki>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高原 浩之（TAKAHARA Hiroyuki）

石川県立大学・生物資源環境学部・生産科学科・准教授

研究者番号：30397898