

ISSN 1345-8086

植物感染生理学研究の未来

PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium:
The Future of Plant-Microbe Interactions Research

植物感染生理談話会論文集（第 57 号）

PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium Report Vol. 57

September 4-6, 2023
Okayama, Okayama

日本植物病理学会
令和 5 年度植物感染生理談話会

Published annually by Plant-Microbe Interactions Symposium,
the Phytopathological Society of Japan (PSJ)

はじめに

「植物感染生理談話会」について振り返れば、「植物病理化学談話会」(1965~77)と「植物感染機作研究談話会」(1967~77)が78年に統合されて「植物感染機作・病理化学談話会」として5年間開催された後(1978~82)、83年から現在の名称に変更されました(日本植物病理学100年史)。途中名称の変更はありましたが、1965年(昭和40年)の第1回植物病理化学談話会から数えて57回目の開催となります。本談話会はまさに20世紀後半からの我が国における植物病理学分野の発展と後進の育成に一翼を担ってきたといえます。本談話会は長い間「夏の学校」として、感染生理学研究に携わる研究者や大学院生・学生が寝食を共にしながら学び、議論する合宿形式で開催されてきました。今回の開催に当たっては、準備開始時にコロナ感染症の状況をまったく予測できず、インターネットの普及とその利便性からオンラインによる開催も考えられました。しかしながら、本談話会が参加者間の信頼・友好関係を築く礎となってきたこと、さらには若い研究者や大学院生諸氏にとっては講師へ直接疑問を投げ掛け、学問的薫陶を受ける貴重な機会となってきたことなどを熟慮し、今回は寝食を共にしないが、十分な感染予防対策を講じてオンサイトで実施することにしました。

今回は、「植物感染生理学研究の未来」と銘打ち、これまで感染生理学研究を牽引し、引き続きリードしていく先生方から本分野を牽引していかれる新進気鋭の15名の先生方に講師としてご登壇をお願いしました。参加者の皆様におかれては、微生物と植物の相互作用にかかわる感染生理学研究の現状について俯瞰的な視点で学び、そして感染生理学研究の「未来」や「それがつくる食の未来」について一緒になって考える機会になればと願っております。残暑厳しい時期での開催になりますが、活発な議論を期待しております。最後に、ご多忙の折にもかかわらず、快くご登壇と要旨の執筆をお引き受け頂いた講師の先生方に、末筆ながら深く御礼申し上げます。

令和5年8月吉日
編者らしるす

目次

機能不明タンパク質へのアプローチ～病原菌エフェクターを例に～	1
高原 浩之 (石川県立大学 生物資源環境学部)	
青枯病菌におけるナス病原性適応の分子機構	9
向原 隆文*・Nur Laili **,***・嘉美 千歳*・一瀬 勇規**	
(*岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・	
** 岡山大学大学院環境生命科学研究科・*** Research Center for Biology, Research	
Organization for Life Sciences, National Research and Innovation Agency (BRIN))	
イネの免疫制御システムの理解とその応用	19
川崎 努・中村 春平・西村 直也・吉久 采花・吉村 智美・山口 公志	
(近畿大学 農学研究科)	
イネ科植物の免疫機構に関する研究	29
香西 雄介 (農業・食品産業技術総合研究機構)	
植物ホルモンによって制御されているイネ白葉枯病抵抗性	37
五味 研二 (香川大学 農学部)	
植物免疫阻害剤の同定とその作用機序	47
石濱 伸明*・白須 賢**,**	
(*理化学研究所環境資源科学研究センター,**東京大学大学院理学系研究科)	
タバコのサリチル酸合成機構	55
加藤 新平*・小寺 由*・田崎 光佑*・小守 啓友*・今野 沙弥香**・高木 公美子*	
(*信州大学大学院総合理工学研究科,** 信州大学農学部)	
活性酸素シグナルによる植物免疫応答の分子機構	65
吉岡 博文*・日野 雄太*・岡本 溪太*・稲田 太一*・小川 尊也*・安達 広明**	
・吉岡 美樹* (*名古屋大学大学院生命農学研究科 植物免疫学研究室,	
**京都大学農学研究科 栽培植物起原学分野)	

植物の全身を巡る病原体との攻防戦略の解明	77
<p>舘田 知佳*・ドミンゲズ ジョン**・清水 元樹**・篠澤 章久***・齋藤 宏昌**** ・西原 昌宏**・藤崎 恒喜** (*岩手大学農学部, **公益財団法人 岩手生物工学研究センター, ***東京農業大学バイオサイエンス学科, **** 東京農業大学分子微生物学科)</p>	
<i>R</i> 遺伝子による陸上植物の抗ウイルス集団抵抗性	85
<p>宮下 脩平*・Derib Alemu Abebe*,***・狩野 凱*・Sietske van Bentum**, *鈴木 万智*・ 西條 悠希*・高橋 英樹* (*東北大学大学院農学研究科, ** Utrecht University, †現 : Debre Berhan University)</p>	
イネの NLR タンパク質によるブルームモザイクウイルス抵抗性	95
<p>三瀬 和之*・鈴木 慎司*・張 一凡*・大竹 竜馬*・嶋本 果穂*・大矢 卓明*・ 鷲津 充彦*・新田 浩二*・高田 昌汰*・清水 元樹**・寺石 政義*・奥本 裕*,***・ 海道 真典*,***・安達 広明*・峯 彰*・寺内 良平**, *高野 義孝* (* 国立大学法人京都大学大学院農学研究科, ** 公益財団法人岩手生物工学研究センター, *** 現 摂南大学農学部)</p>	
野外トランスクリプトームデータを利用した植物病原体の診断と発生調査	105
<p>津島 綾子 (大阪公立大学 農学研究科)</p>	
ダイズ立枯病害防除に関する研究	113
<p>小林 光智衣 (農業・食品総合技術研究所)</p>	
イネーいもち病 GxGome の展望	121
<p>寺内 良平*,** (* 京都大学農学研究科応用生物科学専攻栽培植物起原学分野, ** (公財) 岩手生物工学研究センター)</p>	
植物病原糸状菌の二次代謝産物合成に依存した寄生戦略の進化	129
<p>児玉 基一郎*・赤木 靖典*・高尾 和実*・江草 真由美*・有江 力**・柘植 尚志*** (* 鳥取大学農学部, ** 東京農工大学農学研究院, *** 中部大学応用生物学部)</p>	

機能不明のタンパク質へのアプローチ

～病原菌エフェクターを例に～

高原浩之

Takahara, H.

Approaches to proteins of unknown function

～Functional analysis of pathogen effectors～

ABSTRACT

In recent years, it has become clear that the pathogen effectors have the ability to manipulate plant immune responses and metabolisms. Thus, effectors play an important role in pathogenicity and adaptation to the host plant. However, many of these effectors are not homologous to genes with known functions. Therefore, the function of individual effectors remains to be explored. Approaches to these effectors may require a combination of various methods, including biochemical, molecular, cell biological, genetic and protein structural methods, to elucidate their roles and mechanisms. Here we present examples of secreted effector proteins from *Colletotrichum higginsianum*, the anthracnose fungal pathogen, and discuss future perspectives.

Key words: Effector, *Colletotrichum higginsianum*, Pathogenicity factor, unknown function

石川県立大学生物資源環境学部 Department of Bioproduction Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University, 1-308 Suematsu, Nonouchi, Ishikawa, 921-8836, JAPAN

1. はじめに

植物病原体の感染特異性・宿主特異性を説明するうえでの概念に、遺伝子対遺伝子説 (Gene for gene theory) がある。この概念は、植物病理学・植物育種学者であった H. H. Flor によって提唱され (Flor 1942, 1971)、植物と病原体の間の遺伝的相互作用を説明する基盤になると同時に、感染特異性現象を利用した植物種や品種が持つ抵抗性遺伝子の探索、さらに植物病害防除や抵抗性育種戦略の提供にもつながっている。さらに近年では、感染特異性決定因子の概念が病原体から分泌される因子 (エフェクター) 全般にまで広がり、病原体ゲノム解析に代表される網羅的なアプローチを通じて、膨大かつ多様なエフェクター候補が見出されている。しかしながら、エフェクターの個別の機能については未解明な点が多い。植物感染生理学の観点からも、個々のエフェクターが植物感染にどのように関与するのかを理解することが重要である。

一般に、植物病原体から分泌されるエフェクターは、宿主植物組織内 (または細胞内) で植物の免疫応答や代謝を操作する機能をもつとされており、植物病原体の宿主感染戦略に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、エフェクターをコードする遺伝子の多くは、既知遺伝子と相同性がない、もしくは低いものが多く、遺伝子配列やアミノ酸配列の相同性からエフェクター機能を予測することは、しばしば困難となる。ここでは、筆者がアブラナ科炭疽病病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) を材料に行ってきた、機能不明のエフェクター候補の解析事例を紹介し、今後の展望についても議論する。

2. アブラナ科炭疽病病菌から分泌されるエフェクター候補遺伝子群の同定

筆者がアブラナ科炭疽病病菌 (*C. higginsianum*) のエフェクター候補遺伝子群の探索を始めたのは、かれこれ 15 年以上前にさかのぼる。当時は、植物感染時に発現する遺伝子ライブラリーや発現配列タグ (ESTs) の解析が盛んに行われていた時期でもある。ここでの問題点は、病原菌を接種した植物サンプルには、病原菌のバイオマスが植物バイオマスと比較して圧倒的に少ないことである。その結果、特に感染の初期において、菌由来の遺伝子配列データを取得することが大変困難であった。そこで筆者は、病原菌を接種した植物サンプルに

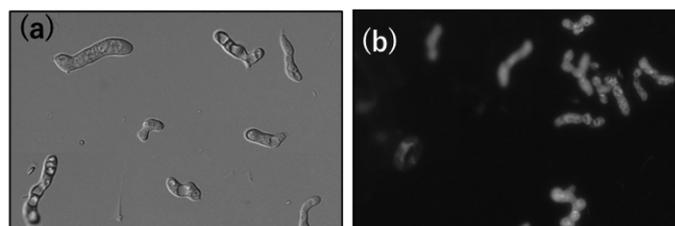


図 1. 接種したシロイヌナズナ葉から分離・精製されたアブラナ科炭疽病病菌の一次侵入菌糸 (a) と剥離した表皮細胞層に含まれる一次侵入菌糸の FDA 染色像 (b).

含まれる病原菌のバイオマスをいかに高めるかに着目し、*C. higginsianum* が感染したシロイヌナズナ葉から、菌の侵入菌糸を生きた状態で高純度に分離精製する技術を構築したり (Takahara *et al.* 2009)、シロイヌナズナ接種葉から一次侵入菌糸が含まれる表皮細胞層を剥離するなどの工夫を行った (Kleemann *et al.* 2012)。それらのサンプル (図 1) を用いて遺伝子ライブラリーの作製、また当時は今と比べられないほど高額であった次世代シーケンサーに供試し、宿主シロイヌナズナ感染時に発現する *C. higginsianum* 由来の遺伝子の同定した (Kleemann *et al.* 2012)。また並行して *C. higginsianum* のゲノム解析も進められ (O'Connell *et al.* 2012, Dallery *et al.* 2017)、約 15000 個の *C. higginsianum* 遺伝子が宿主シロイヌナズナ感染時にどのような発現パターンを示すのかが明らかになった (O'Connell *et al.* 2012)。このようなデータをもとに、様々な予測ツールを用いて宿主感染時に *C. higginsianum* から分泌されるタンパク質をコードする遺伝子群を同定した。これらの中で、既知の遺伝子との相同性が低い、もしくは機能解析が行われていない推定タンパク質をコードする遺伝子を“あえて”選びだし、アブラナ科炭疽病菌エフェクター候補 (*Colletotrichum higginsianum* effector candidates: ChECs) と名付けた。

3. アブラナ科炭疽病菌におけるエフェクターの解析事例

LysM 型エフェクター

C. higginsianum から細胞外に分泌される LysM ドメインを含むタンパク質である ChELP1 と ChELP2 (ChEC90 および ChEC90a) が、宿主植物感染の際にキチン誘導免疫を含む植物免疫応答を抑制することを示した (Takahara *et al.* 2016)。本因子の研究開始当初は、インゲンマメ炭疽病菌 *C. lindemuthianu* から同定されたプロリンリッチの糖タンパク質をコードする遺伝子 *CIH1* (*Colletotrichum Intracellular Hyphae* 1, Perfect *et al.* 1999) とアミノ酸レベルで低い相同性がある、という知見のみであった。その後、トマト葉かび病菌 (de Jonge *et al.* 2010)、イネいもち病菌 (Mentlak *et al.* 2012)、バーティシリウム萎凋病菌 (Kombrink *et al.* 2017) などからも LysM ドメインを持つ分泌型タンパク質をコードする遺伝子が複数単離され、植物によるキチンを介した免疫誘導をかいくぐる病原菌の感染戦略が一般化されたと理解している。これら一連の研究は、タンパク質 2 次構造のドメイン検索から始まり、宿主感染時における遺伝子発現、病原菌の遺伝子変異株による表現型調査、発現タンパク質の活性、糖結合能などから、病原菌 LysM 型エフェクターの機能が推定された。

植物免疫抑制型エフェクター

C. higginsianum からは、植物の免疫応答の指標の一つである細胞死を抑制するタンパク質も同定されている。ChEC3、ChEC3a は、エリシタータンパク質として広く知られている NLP (Necrosis and ethylene inducing peptide1-like protein) が誘導する細胞死を抑制した (Kleemann *et al.* 2012)。このホモログは、かつては *C. gloeosporioides* で同定され (Stephenson *et al.* 2000)、さらに *C. orbiculare* でも同様の機能があることが見出されている (Yoshino *et al.* 2012)。このような機能をもつタンパク質をコードする遺伝子は、エリシターによって誘導される防御応答を抑制する因子「サプレッサー」遺伝子としてとらえることもできる。これまでの研究で、複数の ChECs において、NLP が誘導する植物細胞死を抑制する結果を得ている。このことから、エフェクターによる植物免疫抑制は、植物病原菌において重要かつ共通した感染戦略といえる。現在は、それら因子の作用メカニズムの解析を進めている。

細胞死誘導型エフェクター

C. higginsianum から感染時に分泌されるエフェクター ChEC91 が、植物に細胞死を伴う防御応答様の反応を誘導することを示した (Takahara *et al.* 2021)。解析当初、本エフェクターの配列を BLAST 検索したところ、ニレ類立枯病菌 *Ophiostoma ulmi* から同定された hypersensitive response-inducing protein をコードする遺伝子 (Accession Number: ABK76310) がヒットした。このことから、ChEC91 は植物に対して何らかの作用があると予測していた。しかしながら、*O. ulmi* において、本因子の機能解析やパブリッシュされたデータは見あたらなかった。そこで、アグロインフィルトレーション法を用いて ChEC91 を *Nicotiana benthamiana* 葉で一過的発現を試みたところ、注入部位に激しい細胞死を誘導したことから、本エフェクターの解析をスタートした。組み換えタンパク質による活性、植物応答、病原菌の遺伝子変異株による表現型調査などを行い、ChEC91 の特徴づけを行った。また、昨今のさまざまな病原菌ゲノムのデータより、多くの子囊菌類において本因子のホモログを保有していることが明らかとなった。

4. エフェクターの立体構造と機能

C. higginsianum において、細胞死誘導型エフェクター ChEC91 の立体構造を NMR 解析して構造の比較を行ったところ、塩基配列やアミノ酸配列の相同性ではヒットしないが、構造や機能が非常に類似したタンパク質が見出された。その一方で、*N. benthamiana* 葉における活性が異なる他菌ホモログも存在する (Takahara *et al.* 2021) など、単純には説明できなかった。これらのことから、

これまでのエフェクター解析の手法を見直し、配列から予測できないタンパク質についても、立体構造の視点から注目することが必要であると考えた。近年、タンパク質の立体構造予測アルゴリズムが進化し、予測構造の信頼度が格段に

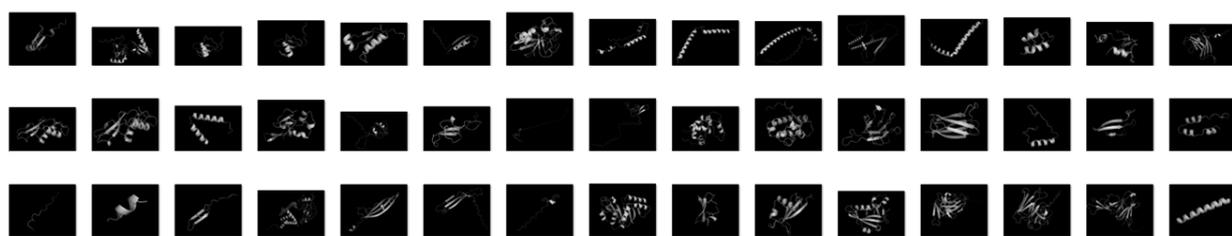


図 2 . Alpha Fold2 で予測した炭疽病菌エフェクターの立体構造モデルの一部.

向上している。特に、深層学習を取り入れたタンパク質立体構造予測ソフトウェア AlphaFold2 (AF2) は、従来のモデリングの水準をはるかに超えた性能を持つことで急速に普及しつつある。そこで、*C. higginsianum* において、AF2 を用いて 100 個以上の ChECs について立体構造の予測を行った (図 2)。今後は、予測した ChECs の構造の特徴や機能について調査していきたい。

5. おわりに

本稿では、機能不明のエフェクターに対するアプローチとして、筆者が行ってきた手法とその結果を、解析当初の背景も含めて簡単に紹介した。病原菌類のエフェクターを比較してみると、それぞれの進化の中で、1) 配列レベルで保存されてきたエフェクター類と、2) 配列は独自に変異しながらもその構造や機能が極めて保存されているエフェクター類の 2 パターンが考えられる。後者におけるエフェクターの機能を推定・解析するステップとして、タンパク質の立体構造からの視点は欠かせない。今後、複数の病原菌の間で立体構造が共通したエフェクターの機能の普遍性を明らかにし、それらが植物感染機構に及ぼす影響を詳細に解析することで、病原菌の種や属を超えたレベルでの **Gene for gene theory** や感染特異性に基づいた効果的な植物病害防除戦略の開発に貢献できると考えられる。このような研究は、農業現場での植物病害の管理や作物生産の向上にも有用な知見を提供するであろう。

網羅的に塩基配列を決定する技術が格段に進化した今日では、ゲノム・トランスクリプトーム解析を組み合わせた方法により、数多くの病原菌エフェクター候補が見出されている。その一方で、実際のタンパク質からの研究アプローチは限られている。筆者も 20 年以上前の修士学生時代に病原体が感染した植物の組織液を回収する実験を試みたが、挫折した経験を持つ。検出技術が発達した現代では、オールドファッションメソッドの中からデータを再発掘することも可能なはずである。そうやって見出されたタンパク質の構造を比較するこ

とで、実はこれまで見出せなかったユニークなデータが隠れているかもしれない。過去の知見と最新の技術や予測アプリをフル活用した、新時代のエフェクター解析アプローチの構築を期待する。

謝辞

本研究の一部は、科研費（20K06055）の助成を受けて実施された。ChEC91のNMR解析は、石川県立大学生物資源環境学部食品科学科の小椋賢治教授にご協力いただいた。AlphaFold2によるタンパク質の構造予測は、北陸先端科学技術大学院大学ナノマテリアルテクノロジーセンターの大木進野教授にご協力をいただいた。ここに記して深謝したい。

引用文献

- Dallery, J. F., Lapalu, N., Zampounis, A., Pigné, S., Luyten, I., Amselem, J., Wittenberg, A. H. J., Zhou, S., de Queiroz, M. V., Robin, G. P., Auger, A., Hainaut, M., Henrissat, B., Kim, K-T., Lee, Y-H., Lespinet, O., Schwartz, D. C., Thon, M. R. and O'Connell, R. J. (2017) Gapless genome assembly of *Colletotrichum higginsianum* reveals chromosome structure and association of transposable elements with secondary metabolite gene clusters. BMC Genomics. 18:667.
- de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M. H. A. J., and Thomma, B. P. H. J (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. Science. 329:953-955
- Flor, H. H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. Phytopathology 32:653–669.
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol. 9:275–296.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E. V. L., van der Does, H. C., Hecquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E. and O'Connell, R. J. (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. PLoS Pathog. 8:e1002643.
- Kombrink, A., Rovenich, H., Shi-Kunne, X., Rojas-Padilla, E., van den Berg, G. C. M., Domazakis, E., de Jonge, R., Valkenburg, D-J., Sánchez-Vallet, A., Seidl, M. F. and Thomma, B. P. H. J. (2017) *Verticillium dahliae* LysM effectors differentially contribute to virulence on plant hosts. Mol. Plant Pathol.18:596-608.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R.,

- Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J. and Talbot, N. J. (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell*. 24:322-335.
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., *et al.* (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44:1060-1065.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J. and Green, J. R. (1999) *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27: 186-198.
- Stephenson, S. A., Hatfield, J., Rusu, A. G., Maclean, D. J. and Manners, J. M. (2000) CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:929-941.
- Takahara, H., Dolf, A., Endl, E. and O'Connell, R. (2009) Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from Arabidopsis leaves for stage-specific transcriptome analysis. *Plant J.* 59:672–683.
- Takahara, H., Hacquard, S., Kombrink, A., Hughes, H. B., Halder, V., Robin, G. P., Hiruma, K., Neumann, U., Shinya, T., Kombrink, E., Shibuya N., Thomma, B. P. H. J. and O'Connell, R. J. (2016) *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity. *New Phytol.* 211:1323–1337.
- Takahara, H., Yamaguchi, S., Omura, N., Nakajima, S., Otoku, K., Tanaka, S., Ogura, K., Kleemann, J. and O'Connell, R. (2021) The *Colletotrichum higginsianum* secreted effector protein ChEC91 induces plant cell death. *J. Gen. Plant Pathol.* 87:344–353
- Yoshino, K., Irieda, H., Sugimoto, F., Yoshioka, H., Okuno, T. and Takano, Y. (2012) Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:625-636.

イネの免疫制御システムの理解とその応用

川崎 努・中村春平・西村直也・吉久采花・吉村智美・山口公志

Kawasaki, T., Nakamura, S., Nishimura, N., Yoshihisa, A., Yoshimura, S., and Yamaguchi, K.

Understanding of rice immune regulatory system and its application

Abstract

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (*Xoo*) delivers a variety of effectors into rice cells. Expression of *Xoo* effector XopY or XopP in rice cells strongly inhibited immune responses induced by the LysM-type receptor-like kinase OsCERK1 that involves recognition of fungal chitin and bacterial peptidoglycan (PGN). XopY interacted with and inhibited OsRLCK185 that functions as an essential immediate downstream signaling component of OsCERK1. We also found that XopP targets OsPUB44, a rice ubiquitin ligase with a unique U-box domain. XopP interacted with the U-box domain of OsPUB44, and inhibited its ubiquitin ligase activity. Two amino-acid residues specific for the OsPUB44 U-box domain are responsible for the interaction with XopP. Since silencing of *OsPUB44* reduced chitin- and PGN-induced immunity, it is likely that OsPUB44 functions as a positive regulator downstream of OsCERK1. We identified PBI1 as an interactor of OsPUB44. Upon chitin perception, PBI1 was ubiquitinated and then degraded, which was suppressed by silencing of *OsPUB44* or expression of *XopP*. These data indicated that PBI1 degradation is mediated by OsPUB44. PBI1 interacted with rice WRKY-type transcription factor WRKY45, a key regulator of rice immunity. In addition, PBI1 suppressed the transcriptional activity of WRKY45. Therefore, it is possible that OsPUB44-mediated degradation of PBI1 leads to activation of WRKY45. Overexpression of *WRKY45* is known to strongly enhance resistance to rice blast and bacterial blight, indicating that *WRKY45* is a useful gene for generation of durable disease resistance plant. However, over-expression of *WRKY45* negatively affects plant growth. Since PBI1 inhibits the WRKY45 activity, co-expression of *PBI1* with *WRKY45* may contribute to reduce a leaky activation of immune response in the absence of pathogens.

Key words: Effector, Pattern recognition receptor, RLCK, Ubiquitin ligase, MAP kinase

1. はじめに

植物は、細胞膜に局在するパターン認識受容体(Pattern recognition receptor (PRR))をもつ。PRRは、病原菌の侵入を、病原菌に特有な分子パターン(Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs))として認識し、様々な防御反応を誘導する。その反応は、Pattern-triggered immunity (PTI)と呼ばれている(Dangl *et al.*, 2013)。一方、病原菌はPTIを阻止するために、植物細胞内にエフェクターと総称されるタンパク質を分泌する。エフェクターは、PTIに関与する宿主因子の機能を抑制したり、病原菌の増殖に必要な栄養源を確保するための働きをもつ。さらに、植物は、エフェクターを認識して、細胞死を伴う強い抵抗性反応を誘導するNB-LRR型受容体(Nucleotide binding (NB) - Leucine-rich repeat (LRR) Receptor (NLR))を獲得している。NLRによって誘導される抵抗性は、Effector-triggered immunity (ETI)と呼ばれている。

PRRは、細胞内にプロテインキナーゼドメインをもつ受容体型キナーゼと、細胞質ドメインをもたない受容体型タンパク質に分けられる。細胞外ドメインは、PAMPを検出するリガンド結合ドメインであり、LRRドメインやLysin-rich motif (LysM)ドメインなどがある。イネのLysM受容体型タンパク質であるCEBiPやLYP4/LYP6は、それぞれ真菌由来のキチンや細菌由来のペプチドグリカン認識するPRRである(Kaku *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012)。イネの受容体型キナーゼであるOsCERK1は、CEBiPやLYP4/LYP6の共役受容体であり、PAMP認識に伴って、OsCERK1はホモダイマーを形成し、細胞内キナーゼドメインが互いにリン酸化することで活性化する(Shimizu *et al.*, 2010)。活性化されたOsCERK1は、OsRLCK185を含む複数の受容体型細胞質キナーゼ(Receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK))をリン酸化する(Yamaguchi *et al.*, 2013; Ao *et al.*, 2014)。さらに、RLCKが様々な下流因子をリン酸化することで、免疫反応を活性化している。これまでの研究により、OsRLCK185がMAPKKKをリン酸化することでMAPキナーゼを活性化すること(Wang *et al.*, 2017; Yamada *et al.*, 2017)、OsRLCK185がカルシウムチャンネルをリン酸化し、細胞内カルシウムの一過的上昇を誘導すること(Wang *et al.*, 2019)、OsRLCK185やOsRLCK118がNADPHオキシダーゼRBOHをリン酸化することで活性酸素生成を誘導することが知られている(Yoshioka *et al.* 未発表; Fan *et al.*, 2018)。同様な制御機構は、シロイヌナズナにおいても報告されている。

PRRやRLCK、その他の植物免疫因子の機能が、ユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解によって制御されていることが知られている(Trujillo, 2018)。このタンパク質分解系では、ユビキチンリガーゼが、標的タンパク質にユビキチンを付加し、ユビキチン修飾されたタンパク質がプロテアソームによって分解される。本稿では、ユビキチン化を介したタンパク質分解によって制御される免疫系について、我々が取り組んでいる研究を紹介する。

2. イネ白葉枯病菌のエフェクターの解析

白葉枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)は、イネの重要病害の一つである。白葉枯病菌は、宿主の核において転写因子として働く Transcription Activator-Like

(TAL)エフェクターと、それ以外として分類される Non-TAL エフェクターをもち、Type III 分泌システムを利用して、エフェクターをイネ細胞内に分泌する。TAL エフェクターは、中央部に特殊な DNA 結合ドメインを、C 末端側に核移行シグナルと転写活性化ドメインをもつ。DNA 結合ドメインは、34 アミノ酸を 1 ユニットとした反復配列により構成されており、各反復配列の 12 番目と 13 番目のアミノ酸が結合する塩基配列の特異性を決めている。イネ白葉枯病菌の TAL エフェクターである AvrXa7 は、細胞膜に局在する糖輸送体をコードする *OsSWEET14* 遺伝子のプロモーターに結合し、転写を活性化する (Antony *et al.*, 2010)。糖輸送体の蓄積により、病原菌が存在するアポプラストへの糖の分泌が促進され、分泌された糖は、病原菌の増殖ための栄養源となっていると考えられている。この TAL エフェクターを認識して ETI を誘導する NLR として、Xa1 が知られている (Yoshimura *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 2016)。我々は、Xa1 が TAL エフェクターの C 末端領域を認識し、AP2/ERF 型転写因子 ERF101 を介して免疫反応を誘導することを明らかにした (Yoshihisa *et al.*, 2022)。一方、多くのイネ白葉枯病菌は、TAL エフェクターに由来すると考えられる interfering TAL (iTAL) エフェクターをもつ。iTAL エフェクターが Xa1 誘導免疫を阻害することが知られているが (Ji *et al.*, 2016; Yoshihisa *et al.*, 2021)、その制御機構は不明である。

京都府立大の津下先生のグループは、イネ白葉枯病菌の 16 個の Non-TAL エフェクターを報告した (Furutani *et al.*, 2009)。我々は、そのうちの 10 個のエフェクターについて、イネ免疫反応の抑制活性を調べるために、エフェクターを発現する形質転換イネを作出した。エフェクターがイネの PTI を抑制しているかどうかを解析するために、各々のエフェクター発現イネに Type III 分泌システムを欠損したイネ白葉枯病菌の *HrpX* 変異株を接種した。野生型のイネでは、*HrpX* 変異株に対して強い PTI を誘導するために、病斑の形成は見られないが、エフェクター発現イネでは病徴の伸展が観察された。このことは、エフェクターがイネの PTI を阻害していることを示唆している。特に、XopY と XopP のエフェクターが激しい病徴を示したことから、これらのエフェクターはイネの主要な免疫因子の活性を阻害していると考えられた。そこで、XopY と XopP が標的としている宿主因子の探索を行った。その結果、XopY の標的因子として OsRLCK185 を (Yamaguchi *et al.*, 2013)、XopP の標的として OsPUB44 を同定した (Ishikawa *et al.*, 2014)。最近、OsRLCK185 が、トビイロウンカのエフェクターの標的になっていることが報告されている (Guo *et al.*, 2023)。

3. XopP による免疫抑制機構

XopP は、アミノ酸配列から機能が推定できない機能未知のエフェクターである。XopP を発現するイネ細胞では、キチンやペプチドグリカンに応答した防御遺伝子の発現が抑制されていた。キチンやペプチドグリカンによる PTI は、OsCERK1 を介して活性化されることから、XopP は OsCERK1、あるいはその下流因子を標的にしていると考えられた。XopP の標的因子を探索するため、酵母 Two Hybrid スクリーニングを行った。その結果、ユビキチン E3 リガーゼをコードする OsPUB44 が得られた。OsPUB44 は、ユビキチンリガーゼ活性をもつ U-

box ドメインとタンパク質間相互作用に関与する Armadillo-repeats (ARM) ドメインをもつタンパク質である。OsPUB44 発現抑制体を作成・解析したところ、白葉枯抵抗性が低下していることに加え、キチンやペプチドグリカンに応答した防御遺伝子の発現が抑制されていることがわかった(Ishikawa *et al.*, 2014)。このことから、OsPUB44 は、免疫誘導のポジティブレギュレーターとして働き、OsCERK1 の下流で制御される因子であることがわかった。

in vitro 実験系を用いた解析により、OsPUB44 の U-box ドメインが、ユビキチンリガーゼ活性をもつことがわかった。XopP と OsPUB44 の相互作用解析により、XopP が OsPUB44 の U-box ドメインに結合することが明らかになった。このことは、XopP が OsPUB44 のユビキチンリガーゼ活性を阻害することを示唆している。実際、*in vitro* ユビキチン化解析により、XopP が OsPUB44 のユビキチンリガーゼ活性を阻害することがわかった(図 1 a ; Ishikawa *et al.*, 2014)。

イネの PUB ファミリーの系統樹解析により、OsPUB44 は、OsPUB45 や OsPUB46 に高い相同性を示すことが明らかになった。しかし、XopP は、OsPUB45 と OsPUB46 の U-box ドメインとは相互作用しなかった。OsPUB44 と OsPUB45 /OsPUB46 とアミノ酸配列を比較したところ、8 個のアミノ酸が異なることがわかった。OsPUB45 /OsPUB46 の 8 個のアミノ酸は、植物の PUB ファミリー間で保存されており、OsPUB44 が特殊な U-box 配列をもつことがわかった。これらの 8 つのアミノ酸の置換体を作製し、相互作用解析を行ったところ、OsPUB44 の 86 番目のロイシンと 94 番目のヒスチジンが、OsPUB44 と XopP の相互作用の特異性を決めていることが明らかになった。データベース解析の結果、OsPUB44 と同じ 8 つのアミノ酸をもつ PUB 遺伝子が、ソルガムなど一部の単子葉植物にのみ存在していることがわかった(Ishikawa *et al.*, 2014)。以上の結果から、XopP は、OsPUB44 のユビキチンリガーゼ活性を特異的に阻害することで免疫を抑制していると考えられた(図 1 b)。

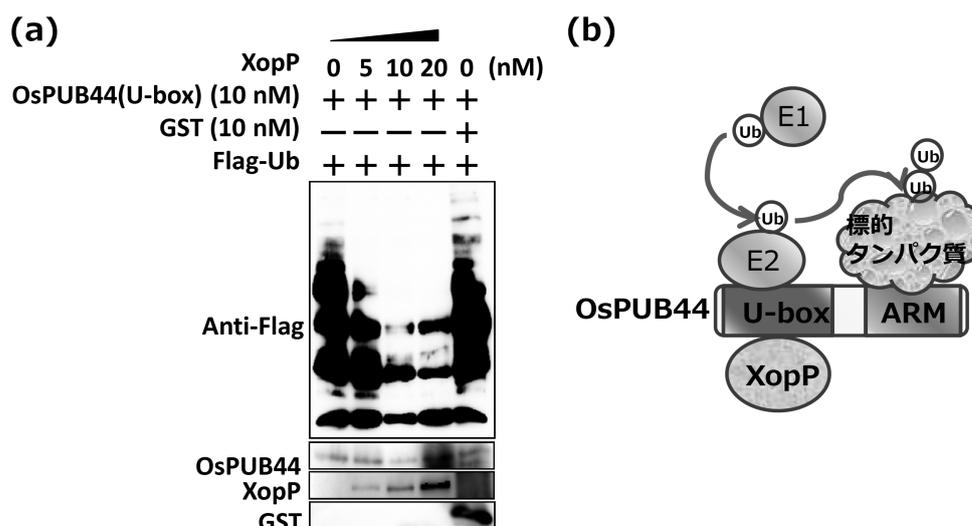


図 1. XopPによるOsPUB44のユビキチンリガーゼ活性の抑制(a)とそのモデル図(b). XopPは、OsPUB44のU-boxに相互作用することで、OsPUB44の活性を抑制する。

4. OsPUB44 と相互作用する PBI1 の分解

OsPUB44 が、免疫のポジティブレギュレーターとして働き、XopP によって阻害されることから、OsPUB44 は、免疫を負に制御する因子をユビキチン化することで免疫を活性化しているのではないかと考えられた。OsPUB44 の基質となる因子を同定するため、OsPUB44 の ARM ドメインを利用して、酵母 Two Hybrid スクリーニングを行った。その結果、DUF1110 ドメインをもつ機能未知なタンパク質が同定され、それを PUB44-Interacting Protein 1 (PBI1) と名付けた(Ichimaru *et al.*, 2022)。PBI1 と相同なタンパク質として、PBI2~PBI4 の 3 つのタンパク質が見出された。免疫沈降や Split NanoLuc Luciferase Complementation (SNLC) 法により、OsPUB44 が、イネ細胞内で PBI1 と相互作用することが示された。さらに、キチンやペプチドグリカン処理により、OsPUB44 と PBI1 の相互作用が強くなることがわかった(Ichimaru *et al.*, 2022)。

PBI1 の機能を推定することを目的として、PBI1 のタンパク質立体構造解析を行った。その結果、PBI1 は、4 つのヘリックスバンドルから成る構造をもつことがわかった。同様な構造は多くのタンパク質で見つかっており、PBI1 の構造から機能を推定することはできなかった(Ichimaru *et al.*, 2022)。

イネ細胞にキチンやペプチドグリカンを処理し、抗 PBI1 抗体を用いたウエスタン解析を行ったところ、PBI1 は、これらの PAMP に応答して、分解されることが明らかになった(図 2 ; Ichimaru *et al.*, 2022)。さらに、OsPUB44 発現抑制体では、キチンに応答した PBI1 の分解が抑制された(図 2)。さらに、キチンに応答して PBI1 がユビキチン化され、このユビキチン化も OsPUB44 発現抑制体で低下していることがわかった。加えて、キチンに応答した PBI1 の分解は、XopP の発現により抑制された。これらの結果から、PBI1 は OsPUB44 を介してユビキチン化され、分解されることがわかった(Ichimaru *et al.*, 2022)。さらに、XopP は OsPUB44 に相互作用することで、OsPUB44 による PBI1 の分解を抑制していることがわかった。しかし、OsPUB44 の全長の組換えタンパク質が非常に不安定であるため、*in vitro* 実験系で、OsPUB44 が直接 PBI1 をユビキチン化するかどうかは解析できていない。

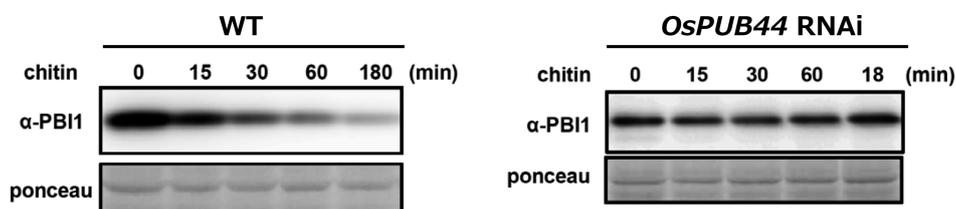


図 2 キチン処理によって誘導される PBI1 の分解

5. PBI1 による WRKY45 の制御機構

PBI1 の機能を探るため、GFP に融合した PBI1 をイネプロトプラストで発現させたところ、PBI1 は核に多く局在していることが明らかになり、PBI1 が転写制御に関わっている可能性が示唆された。そこで、PBI1 と相互作用する免疫関

連の転写因子を探索した。その結果、イネ免疫誘導の鍵因子として知られている WRKY45 が、PBI1 と相互作用することが明らかになった(Ichimaru *et al.*, 2022)。BiFC 法を用いた解析により、PBI1 が核で WRKY45 と相互作用することがわかった。WRKY45 は、W-box と呼ばれるシス配列に結合し、転写を活性化することが知られている。そこで、W-box を含むプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター遺伝子を構築した。イネプロトプラストにおいて、WRKY45 を発現させることで、レポーター遺伝子由来のルシフェラーゼ活性が上昇した。そこに、PBI1 を共発現させると、ルシフェラーゼ活性が減少した。このことは、PBI1 が WRKY45 の転写活性を阻害することを示唆している(Ichimaru *et al.*, 2022)。ゲルシフト法を用いて、PBI1 が WRKY45 の DNA 結合を阻害するかどうかを解析した。しかし、DNA 結合の低下は見られず、PBI1 がどのように WRKY45 の転写活性を阻害しているかは不明である。

PBI1 の機能解析のため、CRISPR/Cas9 システムを用いて PBI1 機能欠損体を作成した。PBI1 機能欠損体は弱い矮性形質を示した。PBI1 機能欠損体では、WRKY45 のタンパク質量が増加していることから、恒常的に免疫が誘導されることにより、矮性形質を示したものと考えられる。イネ白葉枯病菌の接種実験を行ったところ、PBI1 機能欠損体では、野生型に比べ、抵抗性が亢進していることが明らかになった。これは、WRKY45 のタンパク質量の増加により生じていると考えられた。

これまでの研究により、OsCERK1 の下流で、OsRLCK185 – OsMAPKKK11 / OsMAPKKK18 – OsMKK4 / OsMKK5 – OsMPK3 / OsMPK6 のシグナル伝達経路が活性化されることを報告している(Yamada *et al.*, 2017; Bi *et al.*, 2018)。同様なシグナル伝達経路はシロイヌナズナでも保存されている(Yamada *et al.*, 2016)。また、OsPUB44 発現抑制株において、キチンに応答した OsMPK3 と OsMPK6 の活性化は、野生型と同等であるため、OsRLCK185 と OsPUB44 は、OsCERK1 の下流で異なる免疫経路を活性化していると考えていた。一方、WRKY45 は、MAP キナーゼによるリン酸化によって活性化されることが報告されている(Ueno *et al.*, 2015)。そこで、キチンに応答した PBI1 の分解に MAP キナーゼが関与しているかどうかを解析するため、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 の 2 重変異体を用いて解析した。その結果、OsMAPKKK11/OsMAPKKK18 変異体では、PBI1 の分解が抑制されることが明らかになった(Ichimaru *et al.*, 2022)。MAP キナーゼによってリン酸化された WRKY45 は、PBI1 との相互作用が弱くなることから、WRKY45 のリン酸化に伴って、PBI1 が解離し、OsPUB44 を介して分解される可能性が考えられた(図 3)。その一方で、MAP キナーゼが OsPUB44 の活性化に関与している可能性も残されている。

6. OsPUB44 の活性化機構

植物において PUB ファミリーは、様々な生体反応において重要な役割を果たしているが、PUB タンパク質の活性化機構に関しては、あまり理解されていない。OsPUB44 の抗体を用いたウエスタン解析により、キチン処理によって

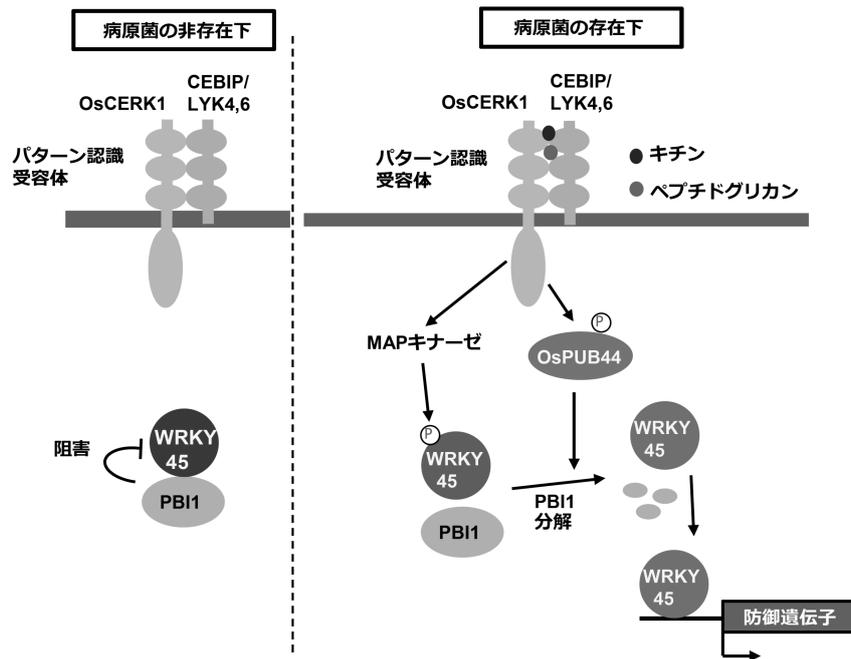


図3 . PBI1を介したWRKY45の活性制御機構. 病原菌の非存在下では, PBI1は, WRKY45の活性化を阻害している. 病原菌認識に伴い, OsPUB44を介して, PBI1が分解され, WRKY45が活性化される.

OsPUB44 のシフトしたバンドが検出された. このシフトしたバンドは, タンパク質脱リン酸化酵素処理により消失することから, OsPUB44 がリン酸化されていることがわかった(Ichimaru *et al.*, 2022). さらに, *OsCERK1* 欠損変異体では, キチンに応答した OsPUB44 のリン酸化は検出されなかった. このことから, OsPUB44 は, *OsCERK1* あるいはその下流に存在するプロテインキナーゼによってリン酸化され, 活性化していると考えられる.

7. PBI1-WRKY45 制御系を利用した耐病性付与技術の開発

WRKY45 過剰発現体は, いもち病菌や白葉枯病菌に対して, 強い抵抗性を示す(Shimono *et al.*, 2007; Shimono *et al.*, 2012). しかし, 植物の成長と免疫にはエネルギーバランスがあり, 恒常的な抵抗性誘導は, 成長を抑制する. 実際, *WRKY45* 過剰発現体の生育は, あまり良いとは言えない. そのため, 病原菌の非存在下では免疫反応が抑制され, 病原菌感染に伴って, 免疫反応が活性化される仕組みが重要である. これまでの解析により, PBI1 が *WRKY45* の活性化を阻害することがわかった. そこで, *WRKY45* と一緒に PBI1 を過剰発現することで, 病原菌の非感染時における *WRKY45* 過剰発現による免疫の漏れが抑制できることが推測される. さらに, 病原菌感染に伴って PBI1 が分解されることで, *WRKY45* 過剰発現の効果によって強い抵抗性が誘導されることが期待できる.

おわりに

病原菌エフェクターを利用した解析により、リダンダントに機能するために遺伝学的手法では見出されなかった植物免疫因子が同定され、それらが PTI において重要な働きをしていることが明らかになってきた。特に、病原菌エフェクターの標的となっている多くの RLCK タンパク質が発見されたことで、PRR によって直接制御される RLCK タンパク質が、PTI における活性酸素生成や、細胞内カルシウムの一過的上昇、MAP キナーゼの活性化をコントロールしていることがわかった。その一方で、1つの PRR に対して、多くの RLCK タンパク質が相互作用していることが明らかになり、PRR が RLCK とどのような複合体を形成し、免疫を活性化しているのかについて、今後の解明が待たれる。

近年の研究により、PUB タンパク質が PRR による病原菌認識から免疫発動に至る様々な過程で重要な働きをしていることが明らかになってきた。しかし、PUB タンパク質の活性化機構に関しては分かっていない部分が多く、今後の研究が期待される。

謝辞

一連の研究を進めるにあたり、数多くの先生方にご支援とご助言をいただきました。特に、京都府立大学教授・津下誠治博士、横浜国立大学教授・児嶋長次郎博士、ミズーリ大学教授・Bing Yang 博士、奈良先端科学技術大学院大学准教授・峠隆之博士には並々ならぬご支援を賜りました。ここに、心から感謝の意を表します。また、これらの研究は、科学研究費補助金、三菱財団研究助成金、戦略的国際共同研究推進事業等によりサポートされてきたことを申し添え、謝意を表します。

引用文献

- Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F. and Yang, B. (2010). Rice *xal3* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell* 22: 3864-3876.
- Ao, Y., Li, Z., Feng, D., Xiong, F., Liu, J., Li, J.F., Wang, M., Wang, J., Liu, B. and Wang, H.B. (2014). OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity. *Plant J.* 80: 1072-1084.
- Bi, G., Zhou, Z., Wang, W., Li, L., Rao, S., Wu, Y., Zhang, X., Menke, F.L.H., Chen, S. and Zhou, J.M. (2018). Receptor-like cytoplasmic kinases directly link diverse Pattern recognition receptors to the activation of mitogen-activated protein kinase cascades in Arabidopsis. *Plant Cell* 30: 1543-1561.
- Dangl, J.L., Horvath, D.M. and Staskawicz, B.J. (2013) Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341: 746-751.
- Fan, J., Bai, P., Ning, Y., Wang, J., Shi, X., Xiong, Y., Zhang, K., He, F., Zhang, C., Wang, R., Meng, X., Zhou, J., Wang, M., Shirsekar, G., Ho, Park, C.H., Bellizzi, M., Liu, W., Jeon, J.S., Xia, Y., Shan, L. and Wang, G.L. (2018). The monocot-specific receptor-like kinase SDS2 controls cell death and immunity in rice. *Cell Host*

- Microbe 23: 498-510.
- Furutani, A., Takaoka, M., Sanada, H., Noguchi, Y., Oku, T., Tsuno, K., Ochiai, H. and Tsuge, S. (2009). Identification of novel type III secretion effectors in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol. Plant Microbe Interact. 22: 96-106.
- Guo, J., Wang, H., Guan, W., Guo, Q., Wang, J., Yang, J., Pen, Y., Shan, J., Gao, M., Shi, S., Shanguan, X., Liu, B., Jing, S., Zhang, J., Xu, C., Huang, J., Rao, W., Zheng, X., Wu, D., Zhou, C., Du, B., Cehn, R., Zhu, L., Zhu, Y., Walling, L.L., Zhang, Q. and He, G. (2023) A tripartite rheostat controls self-regulated host plant resistance to insects. Nature 618: 799-807.
- Ichimaru, K., Yamaguchi, K., Harada, K., Nishio, Y., Hori, M., Ishikawa, K., Inoue, H., Shigeta, S., Inoue, K., Shimada, K., Yoshimura, S., Yakeda, T., Yamashita, E., Fujiwara, T., Nakagawa, A., Kojima, C. and Kawasaki, T. (2022). Cooperative regulation of PBI1 and MAPKs controls WRKY45 transcription factor in rice immunity. Nat. Commun. 13: 2397.
- Ishikawa, K., Yamaguchi, K., Sakamoto, K., Yoshimura, S., Inoue, K., Tsuge, S., Kojima, C. and Kawasaki, T. (2014). Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice. Nat. Commun. 5: 5430.
- Ji, Z., Ji, C., Liu, B., Zou, L., Chen, G. and Yang, B. (2016). Interfering TAL effectors of *Xanthomonas oryzae* neutralize R-gene-mediated plant disease resistance. Nat. Commun. 7: 13435.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 11086-11091.
- Liu, B., Li, J.F., Ao, Y., Qu, J., Li, Z., Su, J., Zhang, Y., Liu, J., Feng, D., Qi, K., He, Y., Wang, J. and Wang, H.B. (2012). Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. Plant Cell 24: 3406-3419.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H. and Shibuya, N. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. Plant J. 64: 204-214.
- Shimono, M., Koga, H., Akagi, A., Hayashi, N., Goto, S., Sawada, M., Kurihara, T., Matsushita, A., Sugano, S., Jiang, C.J., Kaku, H., Inoue, H. and Takatsuji, H. (2012). Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. Mol. Plant Pathol. 13: 83-94.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.J., Ono, K., Toki, S. and Takatsuji, H. (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. Plant Cell 19: 2064-2076.
- Trujillo, M. (2018). News from the PUB: plant U-box type E3 ubiquitin ligases. J. Exp. Bot. 69: 371-384.

- Ueno, Y., Yoshida, R., Kishi-Kaboshi, M., Matsushita, A., Jiang, C.J., Goto, S., Takahashi, A., Hirochika, H. and Takatsuji, H. 2015. Abiotic stresses antagonize the rice defence pathway through the tyrosine-dephosphorylation of OsMPK6. *PLoS Pathog.* 11: e1005231.
- Wang, C., Wang, G., Zhang, C., Zhu, P., Dai, H., Yu, N., He, Z., Xu, L. and Wang, E. (2017). OsCERK1-mediated chitin perception and immune signaling requires Receptor-like cytoplasmic kinase 185 to activate an MAPK cascade in rice. *Mol. Plant* 10: 619-633.
- Wang, J., Liu, X., Zhang, A., Ren, Y., Wu, F., Wang, G., Xu, Y., Lei, C., Zhu, S., Pan, T., et al. 2019. A cyclic nucleotide-gated channel mediates cytoplasmic calcium elevation and disease resistance in rice. *Cell Res.* 29: 820-831.
- Yamada, K., Yamaguchi, K., Shirakawa, T., Nakagami, H., Mine, A., Ishikawa, K., Fujiwara, M., Narusaka, M., Narusaka, Y., Ichimura, K., Kobayashi, Y., Matsui, H., Nomura, Y., Nomoto, M., Tada, Y., Fukao, Y., Fukamizo, T., Tsuda, K., Shirasu, K., Shibuya, N. and Kawasaki, T. (2016). The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *EMBO J.* 35: 2468-2483.
- Yamada, K., Yamaguchi, K., Yoshimura, S., Terauchi, A. and Kawasaki, T. (2017). Conservation of chitin-induced MAPK signaling pathways in rice and Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 58: 993-1002.
- Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., Ochiai, H., Tada, Y., Shimamoto, K., Yoshioka, H. and Kawasaki, T. (2013). A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell Host Microbe* 13: 347-357.
- Yoshihisa, A., Yoshimura, S., Shimizu, M., Sato, S., Matsuno, S., Mine, A., Yamaguchi, K. and Kawasaki T. (2022). The rice OsERF101 transcription factor regulates the NLR Xa1-mediated immunity induced by perception of TAL effectors. *New Phytol.* 236: 1441-1454.
- Yoshihisa, A., Yoshimura, S., Shimizu, M., Yamaguchi, K, and Kawasaki T. (2021). Identification of TAL and iTAL effectors in the Japanese strain T7133 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 87: 354-360.
- Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z.X., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N. and Sasaki, T. (1998). Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1663-1668.

イネ科植物の免疫機構に関する研究

香西 雄介

Kouzai, Y.

Immunity of grass plants against *Rhizoctonia solani*

Abstract

Salicylic acid (SA) is a plant hormone that plays a central role in disease resistance. It is rapidly biosynthesized in response to pathogen attack and elicits various defense responses. Since the exogenous application of SA induces defense responses and improves disease resistance in treated plants, regulatory molecules governing the signaling pathway are promising targets for improving disease resistance in crops through genetic engineering and chemical biology strategies. In this study, we investigated the SA-mediated disease resistance against *Rhizoctonia solani*, a soil-borne necrotrophic fungus that causes sheath blight in grass plants. We recently demonstrated that Bd3-1, an accession of the model grass *Brachypodium distachyon*, is resistant to *R. solani* and, upon inoculation with the fungus, undergoes rapid induction of genes responsive to SA that encodes the WRKY transcription factors (TFs) BdWRKY38 and BdWRKY44. Here, we demonstrate that endogenous SA and these WRKY TFs positively regulate this accession-specific resistance to *R. solani*. In contrast to the susceptible accession Bd21, the resistant accessions Bd3-1 and Tek-3 suppress the infection process before the development of fungal biomass and infection machinery. Comparative transcriptome analysis during pathogen infection revealed that putative WRKY-dependent defense genes were induced more rapidly in the resistant accessions than in Bd21. Gene regulatory network (GRN) analysis based on the transcriptome dataset demonstrated that *BdWRKY38* was a central hub in the GRN, connected to many target genes specifically in resistant accessions, while *BdWRKY44* was shared in the GRNs of all three accessions. Furthermore, overexpression of *BdWRKY38* increased *R. solani* resistance in Bd21. Our findings demonstrate that these resistant accessions can activate an incompatible host response to *R. solani*, and BdWRKY38 mediates this response by mediating SA signaling.

Key words: disease resistance, *Rhizoctonia solani*, salicylic acid, transcriptome, WRKY

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, 305-8517 JAPAN

はじめに

土壌に生息する糸状菌 *Rhizoctonia solani* は、78 科 386 作物に病害を発生させる極めて多犯性の植物病原菌である(Misawa 2015)。本菌は生理・生態・遺伝的性質を異にする菌株からなる種複合体であり、対峙培養時の菌糸融合の有無で 13 の菌糸融合群(anastomosis group, AG)に分類される。イネやトウモロコシでは、*R. solani* AG-1,1A(以下紋枯病菌と表記)が重要病害である紋枯病を引き起こす(Okubara et al. 2014; Singh et al. 2019)。紋枯病の主要な感染源は菌核である。イネでは水田の整備によって土壌中の菌核が水面に浮かび、葉鞘に付着することで感染し、灰色の楕円形病斑を形成する。病原菌が地上部全体にまん延すると、イネの生育は著しく阻害され倒伏をまねく。イネにおける本病害の被害は甚大であり、アジアでは毎年 8-50%の減収をもたらすとされている(Okubara et al. 2014)。農業現場では持続的かつ低コストな防除法である抵抗性品種の導入が望まれているが実現に至っていない。この理由は、紋枯病菌に対して完全な抵抗性を示すイネ系統が見つかっていないためである。従って、イネの栽培における紋枯病菌の防除は長きにわたる課題である。

植物ホルモンの 1 つであるサリチル酸(SA)は、植物免疫において主要な役割を果たす(Vlot et al. 2009)。SA シグナル経路は、抗菌物質の生産、防御応答関連遺伝子の発現、抵抗性遺伝子を起点とする非親和性の相互作用など多様な防御応答に参与する。近年、我々はイネおよびモデル草本植物であるミナトカモジグサを用いて SA と紋枯病抵抗性との関係を調べ、イネおよびミナトカモジグサに SA を与えると抵抗性が付与されること、SA 分解酵素を強発現することで内生 SA を枯渇させたイネは野生型と比べて罹病性が高まることを見出した(Kouzai et al. 2018)。従って、内生 SA は紋枯病菌に対する基礎的抵抗性に寄与する。一般に、SA シグナル経路は活物寄生または半活物寄生の病原菌に対する抵抗性で中心的に働き、紋枯病菌のような殺生菌に対してはジャスモン酸やエチレンを介した防御応答が有効とされる。これらの結果は、紋枯病菌の感染過程に活物寄生ステージが存在し、SA 依存的な防御応答の標的となりうることを示唆している。

植物特異的な WRKY 転写因子は、植物免疫を含む様々な生物学的プロセスを制御する(Phukan et al. 2016)。高度に保存された DNA 結合ドメインを介してプロモーター領域に存在する W-box エlement(TTGAC/T)に結合し、標的遺伝子の発現を調節する。現在までに様々な植物において WRKY 転写因子が同定され、その機能が解明されてきた。最もよく研究されている WRKY 転写因子はシロイヌナズナの AtWRKY70 で、トマト斑葉細菌病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)や灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)を含む細菌や糸状菌に対する抵抗性に寄与する(Li et al. 2006; AbuQamar et al. 2006)。イネでは、SA アナログである benzothiadiazole(BTH)依存的ないもち病菌(*Pyricularia oryzae*)抵抗性を制御する OsWRKY45 が同定されている(Shimono et al. 2007, 2012; Nakayama et al. 2013)。一方、紋枯病菌を含む *R. solani* に対する抵抗性に寄与する WRKY 転写因子はあまり知られていない。我々は、ミナトカモジグサ系統群から紋枯病菌に対し顕著な抵抗性を示す系統を同定し、この系統では菌感染後 24 時間以内に 2 つの WRKY 転写因子 BdWRKY38 と BdWRKY44 の発現が誘導されることを明らかにした。これらはいずれも SA 誘導性で、系統解析から OsWRKY45 の推定オースログと考えられた(Kouzai et al. 2016)。本発表では、ミナトカモジグサの系統特異的な紋枯病抵抗性の解析から見出した紋枯病菌の感染を抑制する免疫機構と、その原動力となる SA シグナル経路と WRKY 転写因子について紹介する。

1. 内生 SA と下流の WRKY 転写因子はミナトカモジグサの系統特異的紋枯病抵抗性に必須である

我々は約 160 系統の 2 倍体ミナトカモジグサ系統群の紋枯病抵抗性を調べ、Bd3-1、Tek-3、Gaz-4 の 3 つの系統が強い抵抗性を示すことを発見した。これらの系統では、SA 誘導性の WRKY 転写因子である BdWRKY38 と BdWRKY44 の発現が菌接種後 24 時間以内に誘導されることから、SA シグナル経路の活性化が起こっていると考えられた。そこで、内生の SA と両 WRKY 転写因子が系統特異的な紋枯病抵抗性に寄与するか調べるため、Bd3-1 背景で SA 分解酵素を強発現する系統(NahG-OX)と両 WRKY 転写因子の発現抑制系統(BdWRKY38-KD および BdWRKY44-KD)を作製した。NahG-OX では内生 SA レベルと紋枯病抵抗性が Bd3-1 野生型と比べて顕著に低下し、罹病性のミナトカモジグサ標準系統 Bd21 と同程度の罹病性を示した(図 1)。また、BdWRKY38-KD および BdWRKY44-KD のどちらも Bd3-1 野生型と比べ抵抗性が低下していたが、低下レベルが遺伝子間で顕著に異なっていた(図 1)。Bd3-1 野生型と比べ、BdWRKY44-KD では病斑形成と接種葉内の菌量がわずかに増加したのに対し、BdWRKY38-KD

ではどちらも罹病性の Bd21 と同レベルまで増加していた。以上の結果から、ミナトカモジグサの系統特異的な紋枯病抵抗性は内生の SA に依存的し、SA シグナル経路下流の BdWRKY38 が中心的な役割を果たすことが示された。

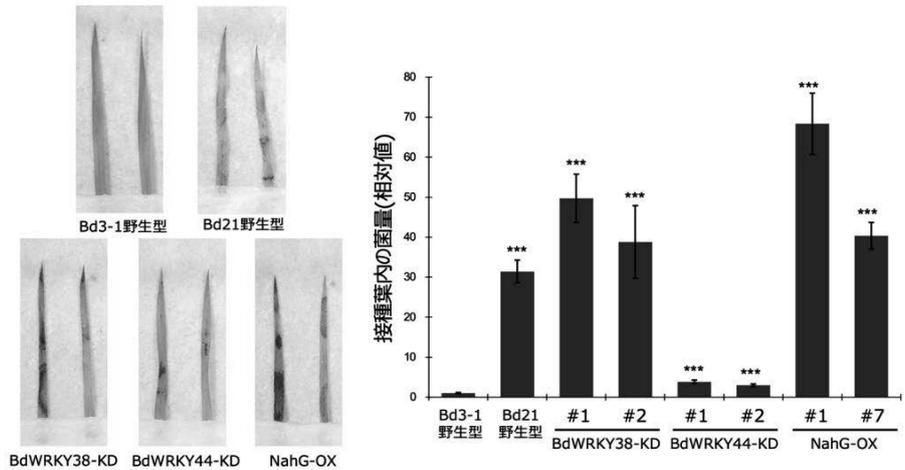


図1. BdWRKY38-KD、BdWRKY44-KD、およびNahG-OXの紋枯病抵抗性

2. 抵抗性系統では紋枯病菌の感染が早期に抑制される

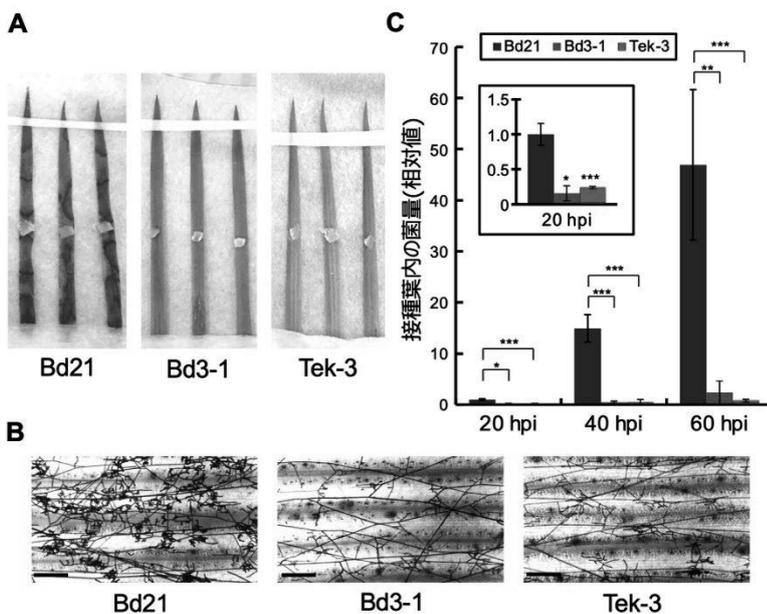


図2. ミナトカモジグサにおける紋枯病菌の感染行動

次に、表現型が安定している Bd3-1 と Tek-3 を用いて抵抗性系統における紋枯病菌の感染行動を調べた。菌接種後 3 日目において、罹病性の Bd21 では葉身全面に病斑の形成がみられたが、Bd3-1 と Tek-3 の両系統ではほぼ病斑が形成されなかった(図 2A)。菌接種後 2 日目において、Bd21 の葉身表面では旺盛な菌糸の進展と感染座の形成がみられたが、Bd3-1 と Tek-3 ではいずれも観察されなかった(図 2B)。そこで、これら 3 系統の接種葉における紋枯病菌量の変化を比較したとこ

ろ、Bd3-1 と Tek-3 では接種後 20 時間以内の早いタイミングで菌の感染行動が抑制されていることがわかった(図 2C)。

3. 抵抗性系統では WRKY 転写因子により制御される防御応答が素早く起動する

罹病性系統 Bd21 と抵抗性系統 Bd3-1 と Tek-3 との紋枯病菌に対する応答を比較するため、菌感染過程における時系列比較トランスクリプトーム解析を行った。抵抗性系統では菌接種後 20 時間以内に感染行動が抑制されているため(図 2C)、接種後 0、4、8、16、24 時間でサンプリングを行い、RNA-seq 解析を行った。得られたデータセットについて主成分分析と相関解析を行ったところ、いずれの系統でも接種後 8 時間以降に大きく遺伝子発現パターンが変化することがわかった。従って、罹病性と抵抗性に関わらずミナトカモジグサは接種後 8 時間以内に紋枯病菌の感染を察知していると考えられた。

次に、菌感染で応答して顕著に発現が変動する遺伝子群(dynamically expressed genes, DYGs)を探索し(Levin et al. 2016)、各系統について約 3500~4000 の DYGs が同定された。選出された DYGs を系統間で比較したところ、その大部分が 3 系統で共通していた(図 3A)。この

結果は、罹病性と抵抗性に関わらず類似した遺伝子セットが菌感染に応答することを示唆する。そこで、紋枯病菌に対する表現型の違いを生み出しているものは防御応答の誘導タイミングであると仮説を立て、DYGs を発現パターンに基づく 6 つのクラスターに分類し、ヒートマップにより可視化した(図 3B)。いずれの系統でも菌接種後 8 時間を境に強く発現する遺伝子が明確に切り替わっており、相関解析の結果を顕著に反映していた。

そこで、防御応答関連遺伝子の発現タイミングを調べるため各クラスターに分類された DYGs の Gene ontology(GO)解析を行った(図 4A)。罹病性の Bd21 では防御応答関連の GO term が菌接種後 16~24 時間で強く発現する遺伝子群で構成されるクラスター 5 と 6 に多

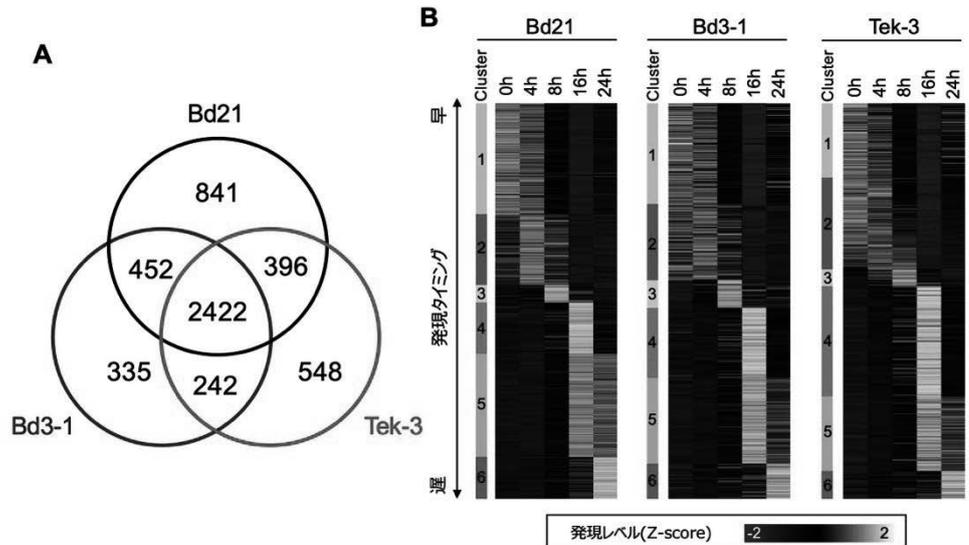


図3. Dynamically expressed genes (DYGs) の発現パターン

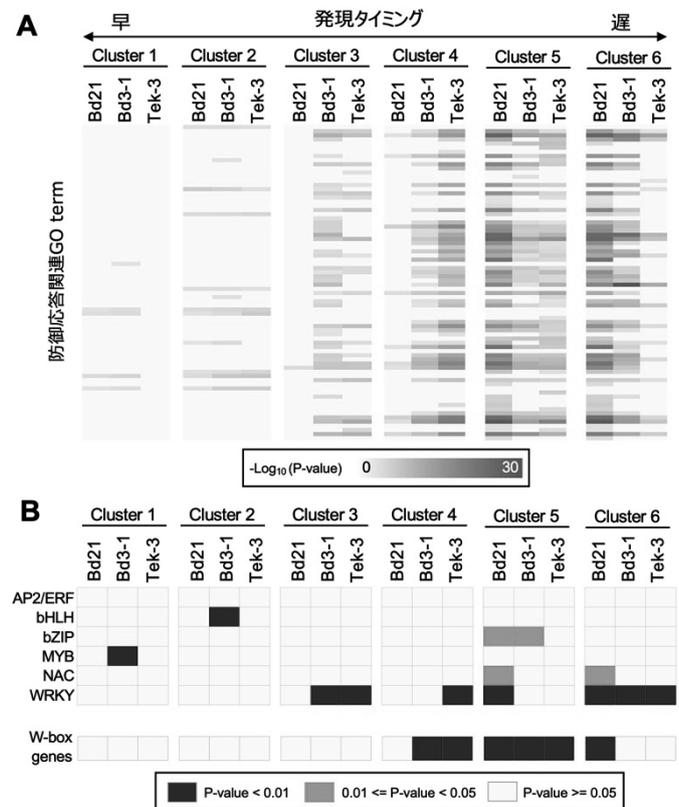


図4. 防御応答関連遺伝子の発現タイミング

く観測されるのに対し、抵抗性の Bd3-1 と Tek-3 では菌接種後 8~16 時間で強く発現する遺伝子群で構成されるクラスター3 と 4 で顕著に観測された。これらの防御応答関連遺伝子の誘導を潜在的に制御する転写因子を探索するため、植物免疫に関与する代表的な転写因子である AP2/ERF、bHLH、bZIP、MYB、NAC、WRKY(Tsuda and Somssich 2015)の発現タイミングを超幾何分布に基づくエンリッチメント解析により調べた(図 4B)。WRKY 転写因子のエンリッチメントパターンは、各系統における防御応答関連 GO term のパターンと明らかに相関しており、罹病性の Bd21 ではクラスター5 と 6 で、抵抗性系統ではクラスター3、4、6 で顕著に観測された。プロモーター領域に W-box を含む遺伝子群の発現タイミングも同様の手法で調べたところ、予想通り各系統で防御応答関連遺伝子の発現が誘導されるタイミングと一致していた。以上の結果から、紋枯病菌に対するミナトカモジグサの防御応答は主に WRKY 転写因子によって制御されており、抵抗性系統では罹病性系統よりも速やかに活性化することが強く示唆された。

4. BdWRKY38 は抵抗性系統の遺伝子制御ネットワークにおいてハブを構成する

紋枯病菌に対する罹病性系統と抵抗性系統の防御応答の違いをさらに特徴づけるため、WRKY 転写因子を DYGs の潜在的な制御因子として設定し、各系統において遺伝子制御ネットワーク (gene regulatory network, GRN) を解析した。推定された各 GRN についてエッジの数と媒介中心性に基づいてハブを構成する WRKY 転写因子を探索したところ、合計 20 の WRKY 転写因子がいずれかの GRN のハブとして同定された。このうち 8 個が罹病性と抵抗性系統の両方でハブを構成し、2 個が罹病性系統に特異的、10 個が抵抗性系統に特異的なハブであった。次に、内生の SA が紋枯病菌に対す

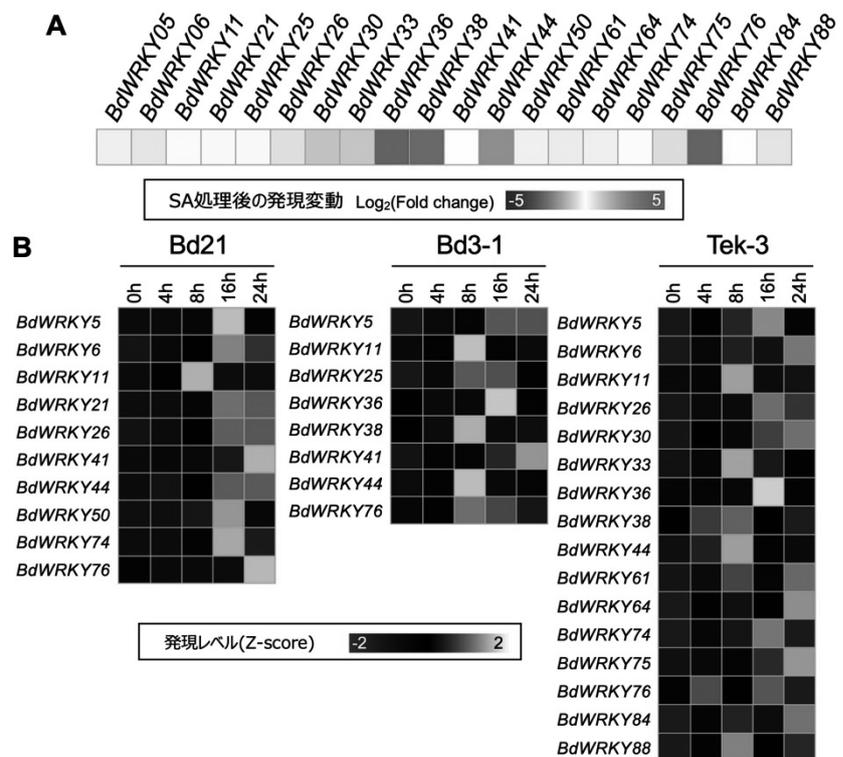


図5. ハブを構成するWRKY転写因子のSAおよび紋枯病菌に対する応答

る基礎的抵抗性と系統特異的な抵抗性(図 2)の両方に寄与することから、ハブを構成する WRKY 転写因子の SA 応答性を調べた。この結果、BdWRKY36、BdWRKY38、BdWRKY44、BdWRKY76 が SA 応答性であった(図 5A)。抵抗性系統の Bd3-1 と Tek-3 では、BdWRKY38、BdWRKY44、BdWRKY76 が紋枯病菌接種後 8 時間以内に誘導され、BdWRKY36 は菌接種後 16 時間で誘導されていた(図 5B)。一方、罹病性の Bd21 では BdWRKY44 と BdWRKY76 の 2 つがハブとして同定され、それぞれ菌接種後 16 時間と 24 時間に誘導されていた(図 5B)。これらの結果および BdWRKY38 の発現抑制によ

り Bd3-1 の罹病性が高まることから(図 2)、BdWRKY38 がミナトカモジグサの系統特異的な紋枯病抵抗性に必要な SA シグナル経路の主要な調節因子であることが示唆された。

5. BdWRKY38 を強発現することで紋枯病抵抗性を付与できる

紋枯病菌における BdWRKY38 の機能をさらに調べるため、罹病性の Bd21 背景で BdWRKY38 を強発現する系統(BdWRKY38-OX)を作製した。BdWRKY38 の強発現によるトランスクリプトームの変化を明らかにするため RNA-seq 解析を行ったところ、野生型の Bd21 と比べて発現変動している遺伝子を 1164 個同定した。遺伝子制御ネットワーク解析で推定された BdWRKY38 の標的遺伝子の 20%にあたる 24 個が発現変動遺伝子に含まれていたことから、BdWRKY38 が GRN における潜在的な標的遺伝子のうちの一部を定常状態でも制御していることが示唆された。また、BdWRKY38-OX の紋枯病抵抗性を調べたところ、系統間ではばらつきはあるものの Bd21 野生型と比べて抵抗性が改善する傾向にあり、一

部の系統では抵抗性の Bd3-1 と同レベルの抵抗性が付与された(図 6)。従って、BdWRKY38 を強発現することで罹病性系統に部分的な紋枯病抵抗性を付与できることが示唆された。

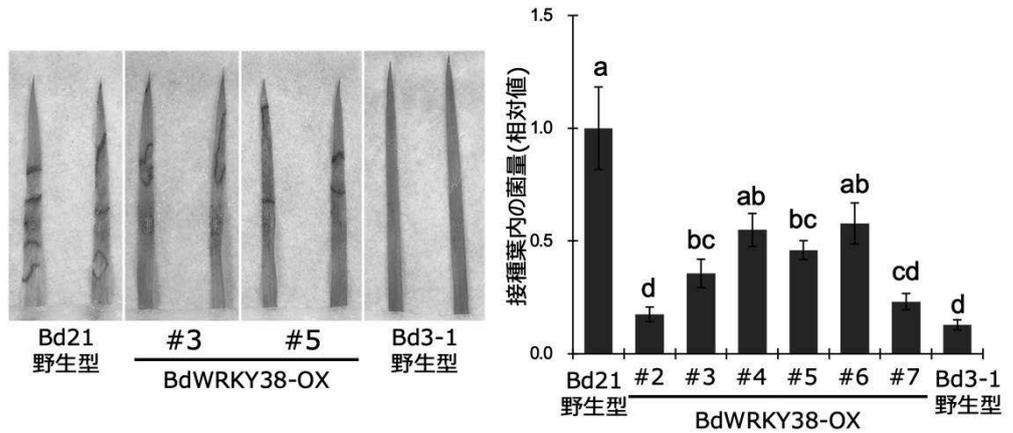


図6. BdWRKY38-OXの紋枯病抵抗性

おわりに

ミナトカモジグサにおける紋枯病抵抗性系統の発見により、紋枯病菌の感染を抑制する防御応答を詳細に解析することができた。これまでのイネを用いた研究により紋枯病菌に対する基礎的抵抗性に内生の SA が寄与することを明らかにしてきたが(Kouzai et al. 2018)、本研究により一部のミナトカモジグサ系統が示す系統特異的な抵抗性も SA 依存的であることが示された。さらに、抵抗性系統では菌感染に反応して素早く防御応答が活性化し、菌感染が早期に抑止されることがわかった。これらの表現型は、抵抗性遺伝子産物を介した防御応答の特徴であることから、紋枯病菌と Bd3-1(おそらく Tek-3 も)との相互作用は病原菌と植物との非親和性相互作用であると考えられる。BdWRKY38 は抵抗性系統の GRN で特異的にハブを構成し、人為的に発現抑制することで系統特異的抵抗性を欠損させる。従って、BdWRKY38 は SA シグナル経路の下流でこの非親和性相互作用を調節する主要な因子であると考えられる。

紋枯病菌のゲノムは既に解読されており、エフェクタータンパク質をコードする遺伝子群も推定されている(Zheng et al. 2013)。さらに最近、ミナトカモジグサへの感染過程で発現が誘導されるエフェクター候補遺伝子群(RsSEPGs)も同定された(Abdelsalam et al. 2020)。これらの情報とミナトカモジグサ系統集団を活用することで、今後、紋枯病菌に対する抵抗性遺伝子の同定が期待される。

本発表に使用した図は、Kouzai et al. BdWRKY38 is required for the incompatible interaction of *Brachypodium distachyon* with the necrotrophic fungus *Rhizoctonia solani* (2020), the Plant Journal, の図を改変したものです。

謝辞

イネ科植物の紋枯病に関する研究は、岡山大学農学部 能年義輝教授の元で開始し、理化学研究所環境資源科学研究センター 持田恵一チームリーダーの元でさらに発展させることができました。両先生からは、研究の進め方や考え方、論文や申請書の書き方まで大変多くのことを学ぶことができました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本研究の実施に当たってお世話になりました理化学研究所バイオ生産情報研究チームおよび岡山大学農学部能年研究室のラボメンバーの皆様に厚くお礼申し上げます。本研究は、科研費研究活動スタート支援(16H07452)、若手研究(18K14469)、理化学研究所基礎科学特別研究員研究費の助成を受けて実施しました。

引用文献

- Abdelsalam SSH, Kouzai Y, Watanabe M, et al (2020) Identification of effector candidate genes of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA expressed during infection in *Brachypodium distachyon*. *Sci Rep* 10:14889
- AbuQamar S, Chen X, Dhawan R, et al (2006) Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to Botrytis infection. *Plant J* 48:28–44
- Kouzai Y, Kimura M, Watanabe M, et al (2018) Salicylic acid-dependent immunity contributes to resistance against *Rhizoctonia solani*, a necrotrophic fungal agent of sheath blight, in rice and *Brachypodium distachyon*. *New Phytol* 217:771–783
- Kouzai Y, Kimura M, Yamanaka Y, et al (2016) Expression profiling of marker genes responsive to the defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* 16:59
- Levin M, Anavy L, Cole AG, et al (2016) The mid-developmental transition and the evolution of animal body plans. *Nature* 531:637–641
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46:477–491
- Misawa T (2015) Current Situation of the Taxonomy and Identification Method of *Rhizoctonia*. *Plant protection* 69:88–91
- Nakayama A, Fukushima S, Goto S, et al (2013) Genome-wide identification of WRKY45-regulated genes that mediate benzothiadiazole-induced defense responses in rice. *BMC Plant Biol* 13:150
- Okubara PA, Dickman MB, Blechl AE (2014) Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Plant Sci* 228:61–70

- Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK (2016) WRKY Transcription Factors: Molecular Regulation and Stress Responses in Plants. *Front Plant Sci* 7:760
- Shimono M, Koga H, Akagi A, et al (2012) Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Mol Plant Pathol* 13:83–94
- Shimono M, Sugano S, Nakayama A, et al (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* 19:2064–2076
- Singh P, Mazumdar P, Harikrishna JA, Babu S (2019) Sheath blight of rice: a review and identification of priorities for future research. *Planta* 250:1387–1407
- Tsuda K, Somssich IE (2015) Transcriptional networks in plant immunity. *New Phytol* 206:932–947
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177–206
- Zheng A, Lin R, Zhang D, et al (2013) The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nat Commun* 4:1424

植物ホルモンによって制御されているイネ白葉枯病抵抗性

五味 剣二

Gomi, K.

Plant hormone-regulated defense mechanisms to rice bacterial leaf blight

Abstract

Rice is one of the most important food crops worldwide and sustainable rice production is important for protecting people from hunger in population increasing countries. Rice bacterial leaf blight caused by hemibiotrophic *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) is one of the serious rice diseases in rice growing-countries. Recent studies in rice-*Xoo* interaction are providing additional insights into the defense regulatory role of phytohormones. We have revealed that jasmonic acid (JA) has an important role in *Xoo* resistance in rice. Application of JA causes upregulation of defense-related genes and accumulation of plant volatiles. Furthermore, our recent studies revealed that JA has various effects to other plant hormone-regulating defense signaling in response to *Xoo* resistance. Here, we introduce the relationship between JA and other plant hormones in the rice-*Xoo* interaction.

Key words: Plant hormone, Jasmonic acid, Rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

香川大学農学部 Faculty of Agriculture, Kagawa university, Miki, Kagawa 761-0795, Japan

はじめに

世界の主要作物であるイネ(*Oryza sativa* L.)は、栽培技術や農薬等のレベルが飛躍的に向上している現在においても、アジアの稲作地域では、かび病と細菌病だけでも毎年の予想収穫量の 20~30%の被害がある。代表的な病害として、かび病では *Magnaporthe oryzae* が引き起こすイネいもち病が挙げられ、細菌病では *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)によって引き起こされるイネ白葉枯病が挙げられる。これら両病原体はその感染様式から、半活物寄生菌(hemi-biotroph)に分類されている(De Vleeschauwer *et al.* 2013)。2010年頃までのこれらの病害抵抗性機構に関する研究は、植物ホルモンの一つであるサリチル酸(SA)が制御している抵抗性メカニズムに関する研究報告例が主であった(De Vleeschauwer *et al.* 2013)。しかしながら近年、植物ホルモンの一つであるジャスモン酸(JA)が制御するシグナル伝達経路が、これらの抵抗性応答に重要であることが報告され始めている。

M. oryzae は感染時に JA を不活型の 12OH-JA に変換する antibiotic biosynthesis monooxygenase (Abm)を分泌することが報告されている(Patkar *et al.*, 2015)。Abm を欠損した *M. oryzae* をイネに接種すると methyl jasmonate (MeJA)が高蓄積することが明らかになっている(Patkar *et al.*, 2015)。この研究より、*M. oryzae* が JA シグナルを不活化することにより感染を成立させようとしていることが明らかとなった。また、イネに JA を処理すると、多くの PR 遺伝子の発現誘導が認められ(Agrawal *et al.*, 2000a; Agrawal *et al.*, 2000b; Rakwal and Komatsu, 2000; Jwa *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003)、さらには、抗菌物質であるジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトン A 及びフラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンの蓄積も確認されている(Nojiri *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 2017)。また、JA 合成酵素遺伝子の一つである *OsAOS2* を過剰発現させたイネでは、イネいもち病への抵抗性が誘導されることが明らかとなっている(Mei *et al.*, 2006)。さらに、別の JA 合成酵素遺伝子の一つである *OsAOC* 遺伝子の機能欠損変異体である *coleoptile photomorphogenesis (cpm2)* や *hebiba* は、JA 及びファイトアレキシンの含量が低下することにより、*M. oryzae* に対する感受性が高くなることが報告されている(Riemann *et al.*, 2013)。さらに、*M. oryzae* は抗菌物質である JA 応答性揮発性テルペンの合成を抑制して感染を成立していることが報告されている(Wang *et al.*, 2023)。

Xoo は、セルラーゼ(ClsA)及びリパーゼ/エステラーゼ(LipA)等の細胞壁分解酵素を分泌するが(Ray *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2007)、これら細胞壁分解酵素合成遺伝子を変異させた *Xoo* は病原性が低下することが報告されている(Rajeshwari *et al.*, 2005; Jha *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007)。一方で、精製した *Xoo* 由来の LipA をイネに処理すると JA 生合成遺伝子の発現誘導や Jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ile)含量の増加が確認され、イネ白葉枯病に対する抵抗性が誘導されることから、これらの分泌酵素が抵抗性を引き起こす因子になる可能性が示されている(Jha *et al.*, 2007; Ranjan *et al.*, 2015)。さらに、*Xoo* 抵抗性イネ品種の JA-Ile 含量は、感受性品種と比べて高いことが報告されている(Liu *et al.*, 2012)。また、間接的にジャスモン酸シグナルが活性化されてもイネ白葉枯病抵抗性が誘導されることも報告されている(Gomi *et al.*, 2010; Kanno *et al.*, 2012)。

近年の罹病性の組み合わせにおける大規模なトランスクリプトーム解析により、*Xoo*

は感染時に JA 応答性遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなった(Tariq *et al.*, 2019)。また、*Xoo* は感染時に、JA 合成の負の制御因子である OsWRKY72 を活性化し、JA 合成を抑制することによって感染を成立させていることも明らかとなっている(Hou *et al.*, 2019)。これらの知見から、イネ白葉枯病抵抗性において、JA が極めて重要であることが明らかとなったが、実際にイネ白葉枯病抵抗性を制御している JA シグナル伝達機構の詳細は不明な点が多いのが現状である。

これまでの当研究室の研究により、イネに JA を処理すると、早期応答と後期応答の 2 相性の JA 応答が見られ、それぞれに特徴的な様々な防御関連遺伝子の発現が誘導され、イネ白葉枯病に対する抵抗性が誘導されることが明らかとなった(Uji *et al.*, 2016)。また、その誘導抵抗機構は、JA シグナルを負に制御する因子である OsJAZ8 の分解が起点となることも明らかとなっている(Yamada *et al.*, 2012)。さらに、OsJAZ8 の制御下にあると思われる転写因子の OsMYC2 が、イネの JA シグナルの早期応答を制御し、イネ白葉枯病抵抗性に正に関与していることも明らかとなっている(Uji *et al.*, 2016)。また、JAZ と複合体を形成する OsNINJA1 は OsSRO1a や OsFHA1 と相互作用し、OsMYC2 の活性を負に制御している(Kashihara *et al.*, 2019; Kashihara *et al.*, 2020; Kashihara *et al.*, 2022)。OsMYC2 と同じ basicHLH 型の転写因子である OsbHLH034 は、イネ白葉枯病抵抗性に重要なリグニンの合成を促進することによってイネ白葉枯病抵抗性を正に制御することも明らかとなっている(Onohata and Gomi, 2020)。さらに、JA シグナルの後期応答の一つとして、複数の植物揮発性物質の蓄積が起こり、それら物質が抗菌性物質や防御関連遺伝子等の発現誘導を引き起こすシグナル性物質として機能し、JA によって誘導されるイネ白葉枯病抵抗性に深く関与していることも明らかとなっている(Tanaka *et al.*, 2014; Taniguchi *et al.*, 2014; Yoshitomi *et al.*, 2016; Kiryu *et al.*, 2018; Kiyama *et al.*, 2021)。このように、当研究室の一連の研究によって、JA によって引き起こされるシグナル伝達機構が、イネ白葉枯病抵抗性に深く関与していることが強く示唆されている。

さらに当研究室の最新の研究により、JA シグナルは、単独でイネに作用するだけでなく、他の植物ホルモンであるオーキシン、アブシジン酸(ABA)、サリチル酸(SA)によって制御されているシグナルに積極的に作用することによってイネ白葉枯病抵抗性を制御していることが明らかとなりつつある。そこで今回は、当研究室の研究で明らかとなった、JA 誘導性のイネ白葉枯病抵抗機構における各ホルモン間の相互作用に焦点を当てて、JA が他のホルモンシグナルをどのように制御し、イネ白葉枯病抵抗性を最大限に発揮しようとしているのかを紹介する。

1. JA-SA

双子葉植物のモデルであるシロイヌナズナやタバコ等を用いた研究から、多くの植物種において、*biotroph* や *hemi-biotroph* な病原体に対する抵抗性には SA が、耐虫性や *necrotroph* な病原体に対する抵抗性には JA が深く関与しており、JA と SA は拮抗関係にあると考えられてきている(Pieterse *et al.*, 2009; Verhage *et al.*, 2010; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Thaler *et al.*, 2012)。*Hemi-biotroph* な病原体である *Xoo* に関しても、これまでの先行研究では SA シグナルに主眼を置いたものが多く、イネ白枯病抵抗性において、

SA が正に寄与していることが数多く報告されている(Bai *et al.*, 2011, Chern *et al.*, 2005, Shimono *et al.*, 2007)。しかしながら、イネは、SA が常時高濃度で蓄積しており、病原体の感染時にその量はほとんど変化しないことが報告されている (Silverman *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2012)。また、SA を高濃度で処理しないと安定的に反応しないので、イネの SA シグナル研究では、アナログであるベンゾチアジアゾール(BTH)が SA シグナル活性化剤として使用されている。このような背景から、イネにおいて、SA シグナルは確実に存在するが、そのシグナルを活性化するのに SA のさらなる増加が必要なのか、さらには、SA シグナルを活性化するのは SA 自身なのかどうかは疑問が残る。

先にも述べたように、SA と同様に、JA もイネ白葉枯病抵抗性に寄与していることが明らかとなっていることから、イネにおいては、これまでのタバコやシロイヌナズナを用いた実験から得られた成果による、JA と SA の拮抗作用の概念はそのまま流用できないことが考えられる。事実、シロイヌナズナで発見された SA シグナルの正の制御因子である ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 (EDS1)のイネホモログである OsEDS1 は、イネ白葉枯病抵抗性において、SA シグナルではなく JA シグナルの正の制御因子として機能することが報告されている(Ke *et al.*, 2019)。また、NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 (NPR1)はイネを含む多くの植物種で SA シグナルの中心的制御因子として機能することが既に明らかとなっているが、イネにおいては、OsNPR1 が活性化すると、JA シグナルも活性化しイネ白葉枯病抵抗性が誘導されることが報告されていることから、OsNPR1 も JA シグナルの正の制御因子として機能する可能性が示されている(Liu *et al.*, 2017)。また、JA 処理によって *OsNPR1* が誘導されることも確認されていることから(Yuan *et al.*, 2007)、イネにおいては、OsNPR1 は SA シグナルだけの制御因子ではない可能性が非常に高い。

我々の研究室で行った JA 処理イネのマイクロアレイ解析(Yamada *et al.*, 2012)と、Shimono (2007)らによって行われた BTH 処理イネのマイクロアレイ解析の結果を比較してみると、BTH 誘導性遺伝子の半数以上が、JA 処理によっても誘導されるということが明らかとなった(Tamaoki *et al.*, 2013)。さらに、JA 誘導性遺伝子の中には、SA シグナルの重要な転写因子である OsWRKY45 も含まれていたことから、イネにおいては JA と SA の両方によって活性化されるシグナル伝達機構が存在していると考えられ、我々は、そのシグナル伝達機構を Common Defense System (CDS)と称して、その正体の解明を試みている(Tamaoki *et al.*, 2013)。現在、CDS を起動する候補因子として、サリチル酸メチル(MeSA)に着目している。MeSA は SA がメチル化された揮発性物質で、JA 処理すると蓄積量が増加する。その後の解析で、MeSA は SA 処理でも BTH 処理でも蓄積することが明らかとなった (鈴木ら未発表)。MeSA をイネに処理すると、供試した CDS 応答性遺伝子の多くが誘導される。さらに、SA メチル化酵素遺伝子を過剰発現し MeSA を高蓄積させたイネは、SA 含量が減少しているにもかかわらず、イネ白葉枯病抵抗性が誘導されたことから、SA 自身の量的変化はイネ白葉枯病抵抗性には重要でないことが明らかとなった (鈴木ら未発表)。

以上のことから、イネの JA シグナルと SA シグナルは CDS を保有し、その起動時には少なくとも MeSA の存在が重要であることが示され始めている。

2. JA-ABA

これまでの研究により、イネに ABA を処理すると、イネ白葉枯病に対して劇的に弱くなることが明らかとなっている。現在、その抵抗性の低下は *Xoo* がイネの ABA シグナルを「ハイジャック」しているためというモデルが提唱されているが(Xu *et al.*, 2013)、その詳細は未だ明らかとなっていない。

当研究室はこれまで、JA 誘導性の植物揮発性物質の機能解析を進めてきているが、その一つである β -cyclocitral が、ABA によるイネ白葉枯病抵抗性の低下を抑制できることが明らかとなった(Taniguchi *et al.*, 2023)。 β -Cyclocitral は β -carotene から carotenoid cleavage dioxygenase (CCD)によって切り出されるアポカロテノイドの一つで、イネでは JA 誘導性の OsCCD4b が β -cyclocitral の合成に関与していることが明らかとなっている(Taniguchi *et al.*, 2023)。 β -Cyclocitral をイネに処理すると、イネ白葉枯病に対する抵抗性が誘導される。さらに、 β -cyclocitral を処理したイネを用いたマイクロアレイ解析等により、 β -cyclocitral は防御関連遺伝子の発現を誘導すると同時に、ABA 合成酵素遺伝子を含む ABA 応答性遺伝子の発現を抑制するという、興味深い現象が明らかとなった(Taniguchi *et al.*, 2023)。この、 β -cyclocitral によって発現が抑制された ABA 応答性遺伝子は、JA によってもその発現が抑制された。また、イネに ABA 処理すると、 β -cyclocitral 含量は減少した一方、JA 及び β -cyclocitral 処理をすると ABA 含量が減少した。さらに、ABA 処理によって低下したイネ白葉枯病抵抗性は β -cyclocitral 処理によって回復することが明らかとなった(Taniguchi *et al.*, 2023)。

以上のことより、JA と ABA はイネ白葉枯病抵抗性において拮抗関係にあり、JA による ABA シグナルの抑制は、JA 誘導性植物揮発性物質の一つである β -cyclocitral によって制御されていることが示唆された。今後の課題として、 β -cyclocitral がどのように認識され ABA シグナルを抑制しているか等の、その詳細なメカニズムの解明が挙げられる。

3. JA-オーキシシン

近年の研究により、古くから知られている植物ホルモンであるオーキシシンもイネ白葉枯病抵抗性に深く関与していることが報告され始めている。*Xoo* は感染時にオーキシシンを分泌することが報告されており、それにより、イネのオーキシシンシグナルを活性化し感染を成立していると考えられている(Ding *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011)。オーキシシンシグナルが活性化すると、細胞壁を緩ませる *expansin* 遺伝子の発現が誘導される。*Expansin* の作用によって細胞壁が緩むと、道管崩壊後の細胞間隙の *Xoo* の移動度の増加や、栄養分等の獲得がしやすくなると考えられている。事実、イネの *expansin* 遺伝子である *OsEXPA1*、*OsEXPA5*、*OsEXPA10* を過剰発現したイネでは、*Xoo* に対する抵抗性が弱まる結果が得られている(Ding *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011)。逆に、内生のオーキシシン含量を減少させた組換えイネでは、*Xoo* に対する抵抗性が誘導されることも明らかとなっている(Li *et al.*, 2015)。さらに、オーキシシンシグナルの制御転写因子である OsARF8 は、OsWRKY45 の発現を抑制することも明らかとなっている(Feng *et al.*, 2022)。以上のことから、オーキシシンはイネ白葉枯病抵抗性に対して負の制御因子と言える。

当研究室で、オーキシシグナルのリプレッサーである *OsIAA13* の機能獲得型変異体でオーキシン非感受性の表現型を示す *Osiaa13* 変異体を用いてイネ白葉枯病抵抗性検定を行ったところ、*Osiaa13* 変異体はイネ白葉枯病に強い抵抗性を示した（宇治ら未発表）。また、*Osiaa13* 変異体では多くの *expansin* 遺伝子の発現が低かった。さらに、オーキシシグナルの正の転写因子である *OsARF6* の発現も有意に低かった（宇治ら未発表）。*OsARF6* はイネ白葉枯病抵抗性における負の制御因子である Raf 様 MAPKKK, Increased Leaf Angle 1 (*OsILA1*) の発現を正に制御している転写因子であることが報告されているので(Chen *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021)、オーキシンにおけるイネ白葉枯病抵抗性の抑制には *OsIAA13* が制御する *OsARF6* シグナルが重要である可能性が示されている。

興味深いことに、*OsIAA13* は JA によっても誘導されることが明らかとなっていることから、JA は *OsIAA13* を介してオーキシシグナルを抑制している可能性が示されている（宇治ら未発表）。事実、*Osiaa13* 変異体は JA 高感受性の表現型を示し、リグニン合成に関与する peroxidase のうち、道管局在型 *OsPrx38* 遺伝子が常時高発現していることが明らかとなっている（宇治ら未発表）。以上のことから、イネ白葉枯病抵抗性において、JA とオーキシンは拮抗関係にある可能性が示された。

イネ病害抵抗性における JA とオーキシシの関係性は、ほとんどの研究者が着目していない研究領域のため未解明な部分が多いのが現状である。当研究室の研究成果が本研究領域の重要性が認識されるきっかけになればと思ひ研究を続けている。

おわりに

イネ病害抵抗性を制御する植物ホルモンに関する研究は、イネの生活環が長いことや研究人口等から、どうしても双子葉モデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究の後手後手となることが多く、常に「シロイヌナズナで明らかとなった〇〇遺伝子は、イネにおいてもほとんど同じ役割であった」という研究になってしまいがちである。事実、当研究室の JA シグナル伝達機構の研究も、研究室発足当初はシロイヌナズナの研究結果を流用した、「イネでも同じであろう研究」という域を脱していなかった。しかしながら、2010 年以降の、我々の研究室を含む世界の研究室で行われているイネ病害抵抗性機構に関する研究は、シロイヌナズナの知見では説明できない「イネ特有の現象説明」の領域に入っているように思える。特に、JA と SA の相互作用と植物揮発性物質に関する研究は、シロイヌナズナの研究例が流用できないイネ特有の現象のため、このまま研究が発展していけば、イネが独自に獲得したの植物ホルモン間シグナル伝達機構を明らかにできる期待がある。今後は、イネ特有の JA シグナル伝達機構を一つでも多く解明し、イネ病害抵抗性研究領域の一助となるように努力したい。

謝辞

本研究の一部は、最先端・次世代研究開発支援プログラム（課題番号 GS022）と基盤研究 C（課題番号 15K07313, 18K05648, 21K05599）の助成を受けて行われた。本研究の基盤を築いて頂きました香川大学の秋光和也教授、片岡郁雄教授、九州沖縄農業研究センターの佐藤雅氏、菅野紘男博士、京大大学生態学研究センターの高林純示教授、小澤理香博士、イネ白葉枯病菌等の材料を提供してくださいました、旧農業生物資源研究所の大橋祐子博士、瀬尾茂美博士、加来久敏博士、名古屋大学の犬飼義明教授に心より感謝いたします。また、本研究成果は香川大学植物防衛応答学研究室の学生諸氏により生み出されました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- Agrawal, G.K., Jwa, N.S. and Rakwal, R. (2000a). A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274: 157-165.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R. and Jwa, N.S. (2000b). Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278: 290-298.
- Bai, W., Chern, M., Ruan, D., Canlas, P.E., Sze-To, W.H, Ronald, P.C. (2011). Enhanced disease resistance and hypersensitivity to BTH by introduction of an NH1/OsNPR1 paralog. *Plant Biotechnol. J.* 9: 205-215.
- Chen, J., Wang, L., Yang, Z., Liu, H., Chu, C., Zhang, Z., Zhang, Q., Li, X., Xiao, J., Wang, S., and Yuan, M. (2021). The rice Raf-like MAPKKK OsILA1 confers broad-spectrum resistance to bacterial blight by suppressing the OsMAPKK4–OsMAPK6 cascade. *J. Integr. Plant Biol.* 63: 1815–1832.
- Chern, M., Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Navarre, D.A. and Ronald, P.C. (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 511-520.
- De Vleeschauwer, D., Gheysen, G., and Höfte, M. (2013). Hormone defense networking in rice: tales from a different world. *Trends Plant Sci* 18:555-565.
- Ding, X., Cao, Y., Huang, L., Zhao, J., Xu, C., Li, X. and Wang, S. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell.* 20: 228-240.
- Feng, Q., Wang, H., Yang, X.M., Hu, Z.W., Zhou, X.H., Xiang, L., Xiong, X.Y., He, X.R., Zhu, Y., Li, G.B., Zhao, J.H., Ji, Y.P., Hu, X.H., Pu, M., Zhou, S.X., Zhao, Z.X., Zhang, J.W., Huang, Y.Y., Fan, J., Wang, W.M., and Li, Y. (2022). Osa-miR160a confers broad-spectrum resistance to fungal and bacterial pathogens in rice. *New Phytol.* 236:2216-2232. doi: 10.1111/nph.18491.
- Fu, J., Liu, H., Li, Y., Yu, H., Li, X., Xiao, J. and Wang, S. (2011). Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. *Plant Physiol.* 155: 589-602.
- Gomi, K., Satoh, M., Ozawa, R., Shinonaga, Y., Sanada, S., Sasaki, K., Matsumura, M., Ohashi, Y., Kanno, H., Akimitsu, K. and Takabayashi, J. (2010). Role of hydroperoxide lyase in white-backed planthopper (*Sogatella furcifera* Horvath)-induced resistance to bacterial blight in rice, *Oryza sativa* L. *Plant J.* 61: 46-57.

- Hou, Y., Wang, Y., Tang, L., Tong, X., Wang, L., Liu, L., Huang, S., and Zhang, J. (2019). SAPK10-mediated phosphorylation on WRKY72 releases its suppression on jasmonic acid biosynthesis and bacterial blight resistance. *iScience*. 16: 499–510.
- Hu, J., Qian, W. and He, C. (2007). The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* *eglXoB* endoglucanase gene is required for virulence to rice. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 273-279.
- Huang, G., Hu, H., van, de, Meene, A., Zhang, J., Dong, L., Zheng, S., Zhang, F., Betts, N.S., Liang, W., Bennett, M.J., Persson, S., and Zhang, D. (2021). AUXIN RESPONSE FACTORS 6 and 17 control the flag leaf angle in rice by regulating secondary cell wall bio-synthesis of lamina joints. *Plant Cell*. 33: 3120–3133.
- Jha, G., Rajeshwari, R. and Sonti, RV. (2007). Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 31-40.
- Jwa, N.S., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Park, C.H. and Agrawal, V.P. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, *JIOsPR10*, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 973-983.
- Kanno, H., Hasegawa, M. and Kodama, O. (2012). Accumulation of salicylic acid, jasmonic acid and phytoalexins in rice, *Oryza sativa*, infested by the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 47: 27-34.
- Kashihara, K., Onohata, T., Okamoto, Y., Uji, Y., Mochizuki, S., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2019). Overexpression of *OsNINJA1* negatively affects a part of OsMYC2-mediated abiotic and biotic responses in rice. *J Plant Physiol.* 232: 180-187.
- Kashihara, K., Onohata, T., Yariuchi, R., Tanaka, S., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2019). The overexpression of *OsSRO1a*, which encodes an OsNINJA1- and OsMYC2-interacting protein, negatively affects OsMYC2-mediated jasmonate signaling in rice. *Plant Cell Rep.* 39: 489-500.
- Kashihara, K., Ojiri, T. and Gomi, K. (2022). Overexpression of OsNINJA1-interacting protein *OsFHA1* affects jasmonate-mediated OsMYC2 signaling but not disease resistance in rice. *J. Gen. Plant Pathol.* 88: 225-231.
- Ke, Y., Kang, Y., Wu, M., Liu, H., Hui, S., Zhang, Q., Li, X., Xiao, J., and Wang, S. (2019). Jasmonic acid-involved OsEDS1 signaling in rice-bacteria interactions. *Rice*. 12: 25.
- Kiryu, M., Hamanaka, M., Yoshitomi, K., Mochizuki, S., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2018). Rice terpene synthase 18 (OsTPS18) encodes a sesquiterpene synthase that produces an antibacterial (*E*)-nerolidol against a bacterial pathogen of rice. *J. Gen. Plant Pathol.* 84:221-229.
- Kiyama, H., Matsunaga, A., Suzuki, G. and Gomi, K. (2021). Monoterpene geraniol produced by rice terpene synthase 21 suppresses the expression of cell-division related genes in the rice bacterial pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 115: 101673.
- Li, W., Wang, F., Wang, J., Fan, F., Zhu, J., Yang, J., Liu, F. and Zhong, W. (2015). Overexpressing *CYP71Z2* Enhances Resistance to Bacterial Blight by Suppressing Auxin Biosynthesis in Rice. *PLoS ONE*. 10: e0119867.
- Liu, H., Li, X., Xiao, J. and Wang, S. (2012). A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: application in study of rice-bacterium interaction. *Plant Methods*. 8: 2.
- Liu, Q., Ning, Y., Zhang, Y., Yu, N., Zhao, C., Zhan, X., Wu, W., Chen, D., Wei, X., Wang, G.L., Cheng, S.,

- and Cao, L. (2017). OsCUL3a Negatively Regulates Cell Death and Immunity by Degrading OsNPR1 in Rice. *Plant Cell*. 29: 345-359.
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G. and Yang, Y. (2006). Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, *PR* gene expression, and host resistance to fungal infection. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19: 1127-1137.
- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N. and Omori T. (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol*. 110: 387-392.
- Ogawa, S., Miyamoto, K., Nemoto, K., Sawasaki, T., Yamane, H., Nojiri, H., and Okada, K. (2017). OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. *Sci Rep*. [https://doi: 10.1038/srep40175](https://doi.org/10.1038/srep40175).
- Onohata, T., and Gomi, K. (2020). Overexpression of jasmonate-responsive OsBHLH034 in rice results in the induction of bacterial blight-resistance via an increase in lignin biosynthesis. *Plant Cell Rep*. 39: 1175-1184.
- Patkar, R.N., Benke, P.I., Qu, Z., Chen, Y.Y., Yang, F., Swarup, S. and Naqvi, N.I. (2015). A fungal monooxygenase-derived jasmonate attenuates host innate immunity. *Nat. Chem. Biol*. 11: 733-740.
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. and Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol*. 5: 308-316.
- Rajeshwari, R., Jha, G. and Sonti, R.V. (2005). Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. *Mol. Plant Microbe Interact*. 18: 830-837.
- Rakwal, R. and Komatsu, S. (2000). Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. *Electrophoresis*. 21: 2492-2500.
- Ranjan, A., Vadassery, J., Patel, H.K., Pandey, R., Mithöfer, A. and Sonti, R.V. (2015). Upregulation of jasmonate biosynthesis and jasmonate-responsive genes in rice leaves in response to a bacterial pathogen mimic. *Funct. Integr. Genomics*. 15: 363-373.
- Ray, S.K., Rajeshwari, R. and Sonti, R.V. (2000). Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Mol. Plant Microbe Interact*. 13: 394-401.
- Riemann, M., Haga, K., Shimizu, T., Okada, K., Ando, S., Mochizuki, S., Nishizawa, Y., Yamanouchi, U., Nick, P., Yano, M., Minami, E., Takano, M., Yamane, H. and Iino, M. (2013). Identification of rice *Allene Oxide Cyclase* mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *Plant J*. 74: 226-238.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. and Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol*. 49: 317-343.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jian, C.J., Ono, K., Toki, S., and Takatsuji, H. (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* 19: 2064–2076.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J.P. and Raskin, I. (1995). Salicylic Acid in Rice (Biosynthesis, Conjugation, and Possible Role). *Plant Physiol*. 108: 633-639.
- Tamaoki, D., Seo, S., Yamada, S., Kano, A., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2013). Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice.

Plant Signal Behav. 8: e24260.

- Tanaka, K., Taniguchi, S., Tamaoki, D., Yoshitomi, K., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2014). Multiple roles of plant volatiles in jasmonate-induced defense response in rice. *Plant Signal Behav.* 9: e29247.
- Taniguchi, S., Hosokawa-Shinonaga, Y., Tamaoki, D., Yamada, S., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2014). Jasmonate induction of the monoterpene linalool confers resistance to rice bacterial blight and its biosynthesis is regulated by JAZ protein in rice. *Plant Cell Environ.* 37: 451-461.
- Taniguchi, S., Takeda, A., Kiryu, M., and Gomi, K. (2023). Jasmonic acid-induced β -cyclocitral confers resistance to bacterial blight and negatively affects abscisic acid biosynthesis in rice. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 1704.
- Tariq, R., Ji, Z., Wang, C., Tang, Y., Zou, L., Sun, H., Chen, G., and Zhao, K. (2019). RNA-Seq analysis of gene expression changes triggered by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in a susceptible rice genotype. *Rice.* 12: 44.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T. and Whiteman, N.K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends. Plant Sci.* 17: 260-270.
- Uji, Y., Taniguchi, S., Tamaoki, D., Shishido, H., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2016). Overexpression of *OsMYC2* Results in the Up-Regulation of Early JA-Responsive Genes and Bacterial Blight Resistance in Rice. *Plant Cell Physiol.* 57: 1814–1827.
- Verhage, A., van Wees, S.C. and Pieterse, C.M. (2010). Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol.* 154: 536-540.
- Wang, L., Xu, G., Li, L., Ruan, M., Bennion, A., Wang, G.L., Li, R., and Qu, S. (2023). The OsBDR1-MPK3 module negatively regulates blast resistance by suppressing the jasmonate signaling and terpenoid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 120: e2211102120. doi: 10.1073/pnas.2211102120.
- Xu, J., Audenaert, K., Hofte, M. and De Vleeschauwer, D. (2013). Abscisic Acid Promotes Susceptibility to the Rice Leaf Blight Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Suppressing Salicylic Acid-Mediated Defenses. *PLoS One.* 27: e67413.
- Yamada, S., Kano, A., Tamaoki, D., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2012). Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice. *Plant Cell Physiol.* 53: 2060-2072.
- Yang, Z., Sun, X., Wang, S. and Zhang, Q. (2003). Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1467-1472.
- Yoshitomi, K., Taniguchi, S., Tanaka, K., Uji, Y., Akimitsu, K. and Gomi, K. (2016). Rice terpene synthase 24 (*OsTPS24*) encodes a jasmonate-responsive monoterpene synthase that produces an antibacterial γ -terpinene against rice pathogen. *J. Plant Physiol.* 191: 120-126.
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q., Yang, D., and He, Z. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol. J.* 5: 313-324.

植物免疫阻害剤の同定とその作用機序

石濱 伸明*・白須 賢**,**

Ishihama, N., and Shirasu, K.

Molecular mechanism of tenoxicam that inhibits plant immune responses.

Abstract

Chemical biology is an interdisciplinary discipline that uses bioactive compounds affecting protein function to elucidate biological mechanisms. A major advantage of the chemical biology approach is the capability to circumvent the limitations of conventional genetics such as lethality and functional redundancy. We are applying chemical biology approach to investigate *Arabidopsis* immune responses to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including salicylic acid (SA), target human cyclooxygenases (COX) and thus block prostaglandin synthesis. In plants, SA functions as a major signaling molecule in immune responses against pathogens. Previously, we identified that the oximic-type NSAID tenoxicam (TNX) exhibits an inhibitory effect on SA-dependent plant immune response with accompanying attenuation of NPR1 protein, a master regulator of SA-dependent signaling. However, the molecular target of TNX in plants remains unknown since there are no close homologs of COX in plants. Here, we report the target identification of TNX in plants. We identified a cupin domain-containing protein, putatively named CUPIN1, as a TNX interactor by a pull-down approach using TNX-immobilized beads. Genetic disruption of both *CUPIN1* and its homolog *CUPIN1h* impairs immunity towards *Pto* and SA-induced accumulation of NPR1. Through transcriptomic analysis, we found that the loss of both *CUPIN1* and *CUPIN1h* significantly enhances the expression level of *UGT76B1 glycosyltransferase*, which is an enzyme that converts immune-related signaling molecules (such as SA and N-hydroxypipicolinic acid) into their respective inactive glucosides. Furthermore, TNX treatment up-regulates *UGT76B1* expression in plants. The phenotypic similarity between the *cupin1cupin1h* double mutant and TNX-treated plant suggests that CUPIN1 and CUPIN1h are molecular targets of TNX. Possible roles of CUPIN1 in plant immune signaling will be discussed.

Key words: plant immunity, salicylic acid, chemical biology, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

* 理化学研究所環境資源科学研究センター Center for Sustainable Resource Science, RIKEN

** 東京大学大学院理学系研究科 Graduate School of Science, The University of Tokyo

1. はじめに

植物は、病原菌由来分子を認識する受容体を備えており、感染を試みる病原菌に対して、活性酸素種の生成や抗菌性タンパク質の蓄積等の一連の植物免疫応答を迅速に誘導する。それに対して一部植物病原菌は、エフェクターと呼ばれる病原性因子を多数分泌することで、宿主植物の免疫応答を抑制する能力を備える。一方、エフェクターに対する受容体を備えた植物では、病原菌認識に伴い自発的な細胞死を伴う強力な免疫反応が引き起こされ、病原菌感染が阻止される。

植物免疫システムの解明を目的として、これまでに様々な順遺伝学的スクリーニングが行われ、多くの植物免疫応答の制御因子が単離されてきた。今後さらに植物免疫システムの理解を前進させるには、順遺伝学的アプローチでは一般に単離が難しい機能重複のある遺伝子ファミリーや、欠損により致死性を示す遺伝子を如何にして単離するかが課題となる。筆者らは、一つの解決策として化学的手法・技術を用いて生命現象の解明を目指すケミカルバイオロジーのアプローチを採用し、植物免疫システムの解明に取り組んできた。本稿では、筆者らの最近の研究成果を概説する。

2. 植物免疫を攪乱する薬剤の探索

サリチル酸 (SA) は、植物免疫応答を制御する内生のシグナル分子であり、病原菌感染によって植物生体内での蓄積量が増加し、植物免疫応答を誘導する。SA 応答の中心的な制御因子として転写補助因子 NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) が単離されており、*NPR1* 遺伝子の欠損は 95%以上の SA 応答性遺伝子の発現に影響を与える (Cao et al., 1997; Wang et al., 2006)。筆者らは、先にダイズ懸濁培養細胞において、比較的低濃度 (10~100 μ M) の SA 処理は、病原菌感染時に強力な免疫応答を誘導する能力を植物へ付与すること (プライミング) を見出した (Shirasu et al., 1997)。その後、この免疫プライミングの分子機構の解明を進める中で、ケミカルバイオロジーのアプローチを取り入れるとともに、モデル植物シロイヌナズナの実験系を採用した。まず筆者らは、植物免疫プライミングを攪乱する薬剤を効率よく選抜するため、シロイヌナズナ懸濁培養細胞と *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) *avrRpm1* の非親和性相互作用をベースにした薬剤評価システムを構築した (図 1; Noutoshi et al., 2012A; Noutoshi and Shirasu, 2018)。この相互作用では、懸濁培養細胞において免疫応答としての自発的な細胞死が誘導され、かつ SA 存在下で細胞死の程度が亢進される。この *Pto* *avrRpm1* に依存した細胞死を植物免疫応答の指標とすることで、96 穴プレートフォーマットでの薬剤の探索が可能となった。これまでに、ChemBridge 社の多様性低分子有機化合物ライブラリー (10,000 個)、MicroSource 社の薬理物・天然化合物ライブラリー (1,920 個)、および理化学研究所が提供する NPDepo 天然化合物ライブラリー (768 個) から薬剤の選抜を実施し、複数の植物免疫を攪乱する薬剤を得た。単離された薬剤には、植物免疫を亢進する薬剤 (植物免疫プライミング剤) と阻害する薬剤 (植物免疫阻害剤) の双方が含まれるが、本稿では主に植物免疫

阻害剤に関する研究成果を紹介する。スクリーニングで得られた植物免疫プライミング剤に関しては、能年の総説あるいは原著論文を参考にさせていただきたい (Noutoshi et al., 2012a; Noutoshi et al., 2012b; Noutoshi et al., 2012c; Noutoshi et al., 2012d; Noutoshi et al., 2012e; 能年, 2017)。

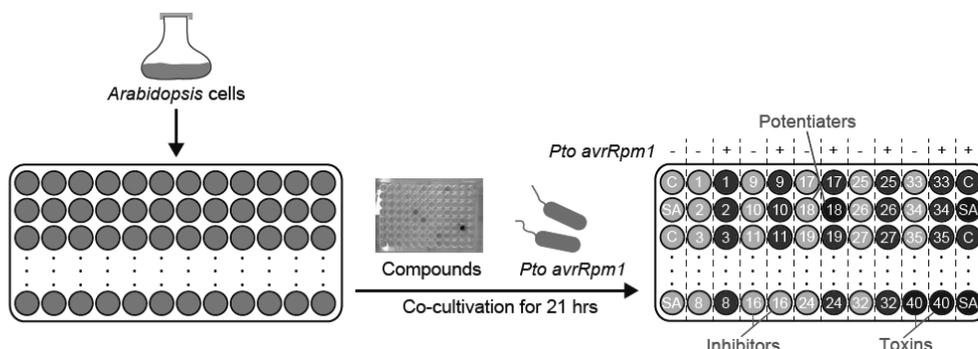


図 1. 植物免疫を攪乱する薬剤を単離するためスクリーニング系

3. オキシカム化合物の植物免疫抑制作用

上述のスクリーニングから筆者らは、非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : NSAIDs) に分類される 3 種のオキシカム化合物 (テノキシカム (tenoxicam: TNX)、メロキシカム、ピロキシカム) を、植物免疫応答に対して抑制的に作用する薬剤として単離した (図 2; Ishihama et al., 2021)。NSAIDs は、ヒト生体内においてプロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼを阻害することで、抗炎症・鎮痛作用を示す医薬品である。同じく NSAIDs に属する SA が植物免疫応答を活性化する一方で、オキシカム化合物が *Pto* に対する抵抗性を抑制したこと、さらに、植物がシクロオキシゲナーゼ遺伝子を持たないことから、植物体内におけるオキシカム化合物の作用機序に興味を持たれた。

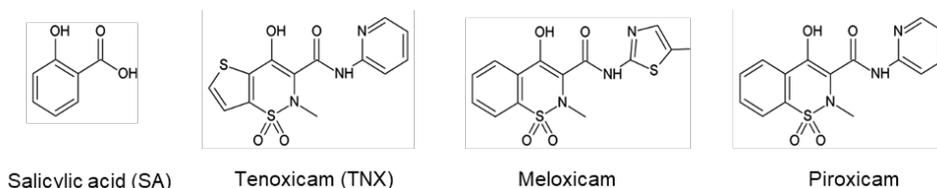


図 2. 植物免疫を抑制するオキシカム化合物の化学構造

まず、TNX の SA 応答への作用を明らかにする目的で、TNX 存在下あるいは非存在下での、*Pto* 感染葉における SA シグナルのマーカー遺伝子 *PR1* の発現量を調べた。すると、TNX 添加により *PR1* の発現量が顕著に抑制されることが分かった。TNX 存在下では、SA に応答した *PR1* の発現誘導も抑制されたことより、TNX が SA に依存した情報伝達に広く作用することが予想された。そこで、SA 処理後の遺伝子発現変動に対する TNX の影響をトランスクリプトーム解析により調べた。その結果、SA により発現量が 2 倍以上増加する

NPR1 依存性遺伝子 631 個のうち、約半数の 313 個が TNX の共処理で 1/2 以下に低下することが明らかとなった。この結果は、TNX の抑制作用が *NPR1* により制御される遺伝子群に広く影響することを示している。

トランスクリプトーム解析の結果より、TNX が *NPR1* それ自体に影響している可能性が浮上した。そこで、SA 処理に応答した *NPR1* の核蓄積に対する TNX の作用を、*NPR1* 遺伝子プロモータの制御下で *NPR1-YFP* を発現するシロイヌナズナを用いて調べた。その結果、SA 処理で誘導される *NPR1* の核蓄積が、TNX の共処理により抑制されることが明らかとなった。*NPR1* 量の抑制が、TNX の作用に関連する可能性が示唆された。

4. TNX 標的タンパク質の単離

TNX による植物免疫阻害の分子メカニズムを明らかにすべく、生化学的な手法でその標的の単離に取り組んだ。まず、光照射下で発生するカルベン種を用いた低分子化合物の固定化法により (図 3; Kanoh et al., 2005)、TNX を固定化したセファロースビーズ (TNX ビーズ) を作成した。本手法では、対象化合物が、セファロースビーズ上のリンカーと官能基非選択的に共有結合を形成するため、固定化に利用する官能基の導入のプロセスを省くことが可能である。TNX ビーズを用いて、シロイヌナズナ野生型 Col-0 の総タンパク質抽出液から TNX 結合タンパク質を精製し、cupin ドメインを含む細胞外タンパク質 (本稿では CUPIN1 とする) を得た。CUPIN1 と TNX 間の相互作用は、精製 CUPIN1 と TNX ビーズの間でも観察されたことから、TNX は CUPIN1 に直接結合すると考えられた。

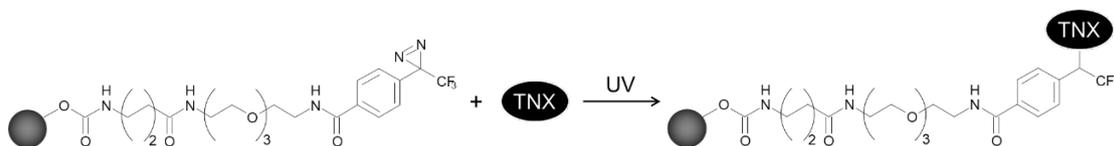


図 3. 光親和型固定化法による TNX 固定化ビーズの作成

5. CUPIN1 の植物免疫における役割

シロイヌナズナ CUPIN1 の植物免疫応答における役割は不明であり、新規の制御因子であることが期待された。そこでまず CRISPR-CAS9 法により *CUPIN1* 遺伝子欠損変異体を作成した。この際、*CUPIN1* と *CUPIN1* 類似遺伝子 *CUPIN1h* が機能重複している可能性が疑われたため、*CUPIN1* および *CUPIN1h* 双方を欠損した二重変異体も併せて作成した。*CUPIN1* あるいは *CUPIN1h* のみを欠損したそれぞれの変異体は、野生型 Col-0 と形態的な差異を示さなかった一方で、*cupin1cupin1h* 二重変異体では、半矮性と背軸側に葉がカールする表現型が観察された。また、*cupin1* 変異体あるいは *cupin1h* 変異体は、*Pto* に対する抵抗性が野生型 Col-0 と同程度であったのに対し、*cupin1cupin1h* 二重変異体は、野生型 Col-0 と比較して抵抗性が低下した。以上から、*CUPIN1* と *CUPIN1h* は、重複した機能を

持つ植物免疫応答の正の制御因子であることが示唆された。興味深いことに、*cupin1cupin1h* 二重変異体において SA 処理後の NPR1 量が野生型 Col-0 と比較して減少した。*CUPIN1* および *CUPIN1h* 双方の遺伝子欠損と TNX 処理が、*Pto* に対する抵抗性および SA に応答した NPR1 蓄積において、同様の表現型をもたらすことが明らかとなった。

続いて、*CUPIN1* および *CUPIN1h* 双方の遺伝子欠損がどのような遺伝子の発現に影響するかを、トランスクリプトーム解析により調べた。その結果、野生型 Col-0 と比較して *cupin1cupin1h* 二重変異体で発現量が 2 倍以上増加する遺伝子として 1130 個、発現量が 1/2 以下に低下する遺伝子として 988 個の遺伝子が同定された。興味深いことに、*cupin1cupin1h* 二重変異体で最も発現量が大きく増加した遺伝子は、配糖化酵素遺伝子 *UGT76B1* であり、その増加量は野生型 Col-0 における発現量の 100 倍以上であった。*UGT76B1* は、SA や全身獲得抵抗性のシグナル分子である N-hydroxyphenylacetic acid (NHP) を生物学的に不活性な配糖体に変換する活性を持ち、その過剰発現体では *Pto* に対する抵抗性が低下する (図 4; Noutoshi et al., 2012A; 石濱・白須, 2018; Bauer et al., 2021; Cai et al., 2021; Holmes et al., 2021; Mohnike et al., 2021)。これより、*cupin1cupin1h* 二重変異体の抵抗性が低下する表現型に、*UGT76B1* の恒常的高発現が寄与する可能性が考えられた (図 4)。抵抗性が低下しない *cupin1* 変異体および *cupin1h* 変異体で、*UGT76B1* の発現量が野生型 Col-0 と同程度であったこと、さらに *UGT76B1* の発現が TNX 処理によって増加したことから、上記の可能性は支持された。現在、*CUPIN1* および *CUPIN1h* 双方の遺伝子欠損や TNX 処理が、実際に SA や NHP の代謝に影響するかを明らかにすべく、それぞれの遊離体および配糖体の定量解析を進めている。

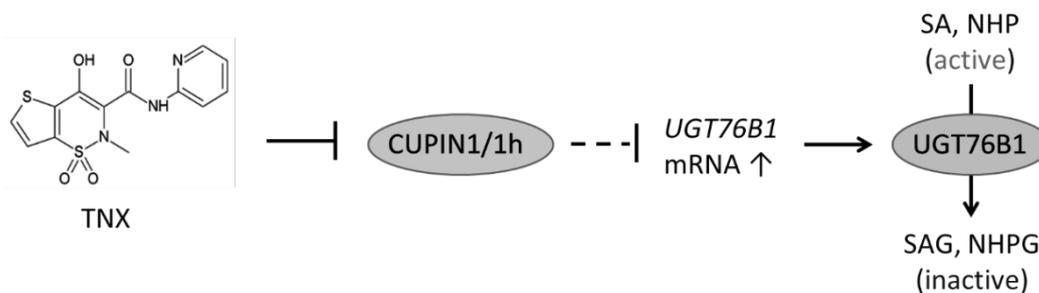


図 4. TNX による植物免疫阻害の作用機序モデル

6. 最後に

筆者らは、TNX を標的探索のための化合物ツールとして利用し、新規な植物免疫制御因子 *CUPIN1* および *CUPIN1h* の同定に成功した。今回、機能重複があるこれら 2 遺伝子を単離できたことは、ケミカルバイオロジーの利点が活かされた結果であると言えよう。また筆者らは、TNX には植物免疫抑制剤としての利用価値もあることを見出している。例えば、アグロバクテリウム法による外来遺伝子導入時に TNX を添加することで、アグロバクテリウムの感染効率を高める作用が見込まれる。実際 TNX の存在下では、シロイヌナズナ葉組

織におけるアグロバクテリウムを介した遺伝子導入の効率が向上した (Choi et al., 2022)。今後、TNX のような植物免疫阻害剤には、新規形質転換法の確立や形質転換効率の向上に伴うコストダウンを通じて、機能性農作物開発を加速させる役割を期待したい。

先に筆者らは、植物免疫プライミング剤として同定したインプリマチン A 群および B 群が、感染応答時に SA の SA 配糖体への代謝を阻害する作用を持ち、その標的タンパク質の一つが UGT76B1 であることを見出していた (Noutoshi et al., 2012a)。そのため、*cupin1cupin1h* 二重変異体で発現が変動する遺伝子の解析から、改めて *UGT76B1* を研究対象とするに至ったことは、大変な驚きであった。本研究を通じて、シロイヌナズナの免疫応答において、免疫シグナル分子の代謝調節がいかに重要であるかを改めて実感させられた。

これまでの生化学的・構造生物学的解析から、CUPIN1 は細胞外で安定なホモ 6 量体を形成し、それぞれのサブユニットが 1 つのマングンイオンを含むことまでを明らかにした。しかしながら、依然 CUPIN1 の生化学的機能の解明には至っていない。筆者らは、CUPIN1 が膜貫通領域を持たない細胞外タンパク質でありながら、植物免疫応答の制御因子として機能する点を非常にユニークであると考えている。今後 CUPIN1 の機能解析を通じて、細胞外由来の内生シグナルに依存した新規な植物免疫制御機構を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP23K05157, JP22H00364, JP17H06172 の支援を受けて実施しました。

引用文献

- Bauer S, Mekonnen DW, Hartmann M, Yildiz I, Janowski R, Lange B, Geist B, Zeier J, Schäffner AR. UGT76B1, a promiscuous hub of small molecule-based immune signaling, glucosylates N-hydroxypipicolinic acid and balances plant immunity. (2021) *The Plant Cell* 33:714–734.
- Cai J, Jozwiak A, Holoïdovsky L, Meijler MM, Meir S, Rogachev I, Aharoni, A. Glycosylation of N-hydroxy-pipicolinic acid equilibrates between systemic acquired resistance response and plant growth. (2021) *Molecular Plant* 14:440–455.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X. The Arabidopsis *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. (1997) *Cell* 88:57–63.
- Choi S, Kumaishi K, Motohashi R, Enoki H, Chacuttayapong W, Takamizo T, Saika H, Endo M, Yamada T, Hirose A, Koizuka N, Kimura S, Kawakatsu Y, Koga H, Ito E, Shirasu K, Ichihashi Y. Oxycam-type NSAIDs enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in plants. (2022) *Plant Biotechnology* 39:323–327.

- Holmes EC, Chen Y-C, Mudgett MB, Sattely ES. *Arabidopsis* UGT76B1 glycosylates *N*-hydroxy-pipecolic acid and inactivates systemic acquired resistance in tomato. (2021) *The Plant Cell* 33, 750–765.
- Ishihama N, Choi S-W, Noutoshi Y, Saska I, Asai S, Takizawa K, He, SY, Osada H, Shirasu K. Oxycam-type nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit NPR1-mediated salicylic acid pathway. (2021) *Nature Communications* 12:7303.
- 石濱伸明・白須賢 植物微生物相互作用におけるサリチル酸合成と代謝. (2018) 植物の生長調節 p53-59.
- Kanoh N, Honda K, Simizu S, Muroi M, Osada H. Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics. (2005) *Angewandte Chemie International Edition* 44:3559–3562.
- Mohnike L, Rekhter D, Huang W, Feussner K, Tian H, Herrfurth C, Zhang Y, Feussner I. The glycosyltransferase UGT76B1 modulates *N*-hydroxy-pipecolic acid homeostasis and plant immunity. (2021) *The Plant Cell* 33:735–749.
- Noutoshi Y, Okazaki M, Kida T, Nishina Y, Morishita Y, Ogawa T, Suzuki S, Shibata D, Jikumaru Y, Hanada A, Kamiya Y, Shirasu K. Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glycosyltransferases in *Arabidopsis*. (2012a) *The Plant Cell* 24:3795–3804.
- Noutoshi Y, Jikumaru Y, Kamiya Y, Shirasu K. ImprimatinC1, a novel plant immune-priming compound, functions as a partial agonist of salicylic acid. (2012b) *Scientific Reports* 2:705.
- Noutoshi Y, Okazaki M, Shirasu K. Isolation and characterization of plant immune-priming compounds ImprimatinB3 and-B4, potentiators of disease resistance response in *Arabidopsis thaliana*. (2012c) *Plant Signaling & Behavior* 7:1526–1528.
- Noutoshi Y, Ikeda M, Shirasu K. Diuretics prime plant immunity in *Arabidopsis thaliana*. (2012d) *PLoS One* 7:e48443.
- Noutoshi Y, Ikeda M, Saito T, Osada H, Shirasu K. Sulfonamides identified as plant immune-priming compounds in high-throughput chemical screening increase disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. (2012e) *Frontiers in Plant Science* 3:245.
- 能年義輝 プラントアクティベーターの探索研究の動向. (2017) 植物防疫 71:69–73.
- Noutoshi Y and Shirasu K. A High-throughput chemical screening method for inhibitors and potentiators of hypersensitive cell death using suspension cell culture of *Arabidopsis thaliana*. (2018) *Plant chemical genomics: Methods in Molecular Biology* 1795:39–47.
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C. Salicylic acid potentiates a gain-control amplifying pathogen signals for activation of plant disease resistance mechanisms. (1997) *The Plant Cell* 9:261–270.

Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. (2006) PLoS Pathogens 2:1042–1050.

タバコのサリチル酸合成機構

加藤 新平*・小寺 由*・田崎 光佑*・小守 啓友*・今野 沙弥香**・高木 公美子*

Katou, S., Kotera, Y., Tasaki, K., Komori, H., Imano, S., and Takagi, K.

Molecular mechanisms underlying the biosynthesis of salicylic acid in tobacco.

Abstract

Salicylic acid (SA) is a phytohormone which plays a pivotal role in plant responses against various forms of environmental stress, particularly pathogen infection. In the tissue attacked by pathogens, the biosynthesis of SA is induced and SA, in turn, induces a variety of downstream defense responses. It is widely accepted that at least two different pathways operate in SA biosynthesis: isochorismate synthase (ICS) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) pathways. In *Arabidopsis thaliana*, the ICS pathway consisted of ICS1, EDS5, PBS3 and EPS1 predominantly contributes to SA synthesis induced by pathogen infection. On the other hand, earlier reports have suggested that the PAL pathway is a main route for pathogen-induced SA production in tobacco; however, the underlying mechanisms were largely unknown for a long time. In this chapter, we summarize our recent findings on the mechanisms underlying SA biosynthesis and its activation in tobacco.

Key words: disease resistance, hypersensitivity-related genes, ICS pathway, PAL pathway, peroxisomal β -oxidative pathway, salicylic acid

* 信州大学大学院総合理工学研究科 Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

**信州大学農学部 Faculty of Agriculture, Shinshu University

1. はじめに

植物には微生物に対する様々な生体防御機構が備わっており、微生物を認識した細胞においては多様な防御応答が誘導される。また、局所的な防御応答の発動が引き金となり、植物体全体で全身獲得抵抗性 (SAR) と呼ばれる幅広い病原体に対する抵抗性が誘導される。防御応答の誘導には、植物の細胞表層に存在するパターン認識受容体による微生物構成成分の認識により開始されるもの (PTI) と、植物の抵抗性タンパク質による病原体エフェクターの認識により開始されるもの (ETI) の主に 2 種類が存在する (Jones and Dangl 2006)。PTI と ETI において観察される反応には共通点が多いが、一般的に ETI の方が強力な反応であり、多くの場合過敏感反応 (HR) と呼ばれる急速な細胞死を伴う。微生物の認識から防御応答の誘導へと至る情報伝達には、活

性酸素種, mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ, 植物ホルモンといった多様な分子種が関与している。そのような情報伝達分子の一つにサリチル酸 (SA) がある。SA は“防御ホルモン”とも呼ばれる植物ホルモンの一種であり、微生物に対する生体防御機構において重要な役割を果たす (Peng *et al.*, 2021)。防御ホルモンとしての SA に関する研究は歴史が長く、タバコ葉をアセチルサリチル酸で処理するとタバコモザイクウイルス (TMV) に対する抵抗性が誘導されることが、約半世紀前の 1979 年に報告されている (White 1979)。1990 年になると、病原体を接種したタバコやキュウリにおいて、内在性の SA 濃度が上昇することが報告され (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990), SA が植物内在性のシグナルとして防御応答を誘導することが示唆された。その後、細菌の SA 分解酵素である NahG を発現する形質転換タバコおよびシロイヌナズナ (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993) やシロイヌナズナの各種変異体 (Peng *et al.*, 2021) を用いた解析より、SA が PTI, ETI および SAR において重要な役割を果たすことが明らかになった。また、シロイヌナズナにおいては、SA 合成機構の全体像が解明されると共に、SA の受容体として 3 種類の NPR タンパク質が同定された (Peng *et al.*, 2021)。一方、その重要性にも関わらず、シロイヌナズナ以外の植物種における SA 合成機構はほとんど解明されていない。本章では、これまでの SA 合成機構に関する研究を振り返るとともに、タバコの SA 合成機構に関する筆者らの最近の成果を紹介したい。

2. PAL 経路と ICS 経路

初期の SA 合成機構に関する研究は、フェニルプロパノイド経路の開始酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) を中心に行われた。PAL はフェニルアラニンを脱アミノ化してケイ皮酸を合成する酵素であり、ケイ皮酸よりリグニンやフラボノイド等の重要な二次代謝産物が合成される。PAL の発現が病原体により誘導されることが様々な植物種において明らかになり、SA はケイ皮酸から合成されると考えられた。実際、PAL の発現が抑制されたタバコ (Pallas *et al.*, 1996) や PAL 阻害剤を処理したシロイヌナズナ (Mauch-Mani and Slusarenko 1996) およびジャガイモ (Coquoz *et al.*, 1998) では、病原体に応答した SA 蓄積量が減少することが報告された。また、タバコにおいては、ケイ皮酸から合成された安息香酸を安息香酸 2-水酸化酵素

(BA2H) が水酸化して SA を合成するという SA 合成経路が提唱された (León *et al.*, 1995). BA2H は可溶性の高分子量シトクロム P450 であると予想されたが, その実体は不明なままである. 一方で 2001 年になると, 病原体に応答した SA 合成が起きないシロイヌナズナ *sid2* 変異体の原因遺伝子が, イソコリスミ酸合成酵素 (ICS) をコードする *ICS1* であることが明らかになった (Wildermuth *et al.*, 2001). トマトやベンサミアナタバコにおいても, *ICS* の発現が病原体ストレスにより誘導されること (Shibata *et al.*, 2010; Uppalapati *et al.*, 2007), *ICS* の発現をウイルス誘導性遺伝子発現抑制 (VIGS) 法 (Ratcliff *et al.*, 2001) で抑制すると, 病原体や UV に応答した SA 合成が抑制されることが報告された (Catinot *et al.*, 2008; Uppalapati *et al.*, 2007). これらの結果から, 植物には PAL を介する PAL 経路と *ICS* を介する *ICS* 経路の少なくとも 2 つの SA 合成経路が存在すると考えられた. その後, PAL, *ICS* あるいはその両方が SA 合成に関与することが様々な植物種で報告されてきたが (Peng *et al.*, 2021), シロイヌナズナの *ICS* 経路を除き, SA 合成経路の全体像は不明なままである.

3. シロイヌナズナの SA 合成機構

これまでに全体像が解明された唯一の SA 合成経路がシロイヌナズナの *ICS* 経路である (Rekhter *et al.*, 2019; Torrens-Spence *et al.* 2019). 本経路は, 葉緑体内に存在する *ICS* によりコリスミ酸がイソコリスミ酸に変換されることで開始される. シロイヌナズナには *ICS1* と *ICS2* という 2 種類の *ICS* 遺伝子が存在するが, 病原体に対して発現が誘導されるのは *ICS1* のみであり, *ICS1* が主にストレスに応答した SA 合成に関与している (Garcion *et al.*, 2008; Wildermuth *et al.*, 2001). *ICS* により合成されたイソコリスミ酸は, 直接的な証拠は無いが MATE 型輸送体様タンパク質である *EDS5* により細胞質に排出されると考えられている. 細胞質において, イソコリスミ酸は *PBS3* の触媒によりグルタミン酸と結合し, isochorismate-9-glutamate となる. *PBS3* の活性が SA により阻害されることから, *PBS3* は SA 合成の鍵酵素であると考えられる (Okrent *et al.*, 2009). SA 合成の最終段階は isochorismate-9-glutamate の SA と *N*-pyruvoyl-*L*-glutamate への分解である. 本反応は自発的にも起きるが, *EPS1* により増強される. *ICS* 経路を介した SA 合成は主に転写レベルで制御されており, 2 種類の calmodulin (CaM)-binding protein 60 (CBP60) 型転写因子である *CBP60g* と *SARD1* が転写制御の中心的な役割を果たしている (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). 両タンパク質は, *ICS1*, *EDS5* および *PBS3* といった SA 合成遺伝子だけでなく, 様々な防御遺伝子のプロモーターに結合することから, SA 合成を含む病害抵抗性全般において重要な役割を果たすと考えられている (Sun *et al.*, 2015). 興味深いことに, *ICS* がこれまでにゲノムが解読された全ての植物種に存在するのに対し, *PBS3* と *EPS1* のオーソログと考えられる遺伝子はアブラナ科植物以外ではほとんど認められない (Zhang *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2009). そのため, シロイヌナズナの *ICS* 経路と同様の SA 合成経路がアブラナ科以外の植物種にも存在するかどうか, 今後の研究が待たれる.

4. MAP キナーゼ抑制体を用いたタバコの SA 合成機構の解明

タバコにおいては PAL 経路で SA が合成されると考えられてきた. 実際, TMV 感

染により SA の合成が活性化されたタバコ葉において、*PAL* の発現は誘導されるが、*ICS* の発現は誘導されない (Ogawa *et al.*, 2006). MAP キナーゼは植物の環境ストレス応答を誘導する重要な情報伝達タンパク質である. タバコにおいては、*WIPK* と *SIPK* という 2 種類の MAP キナーゼが傷害や TMV 感染等の様々なストレスにより活性化される (Zhang and Klessig 2000). 興味深いことに、*WIPK* と *SIPK* の両方の発現が抑制されたタバコ (*WIPK/SIPK* 抑制体) においては、本来傷害により誘導されない SA の合成が傷害により誘導される (Seo *et al.*, 2007). 筆者らはこの *WIPK/SIPK* 抑制体における傷害に応答した SA 合成を、薬剤処理により同調的かつ強力に誘導できる実験系を構築した (Katou *et al.*, 2013). 本実験系を用いて、SA 合成に相関して発現が誘導される遺伝子群をマイクロアレイ解析により同定し、各遺伝子のベンサミアナタバコ葉での過剰発現が SA 合成を誘導するか調べた. その結果、*CBP60* 型転写因子と CaM 様タンパク質が SA 合成を活性化することが明らかになった (Takagi *et al.*, 2022). *CBP60* 型転写因子の推定アミノ酸配列はシロイヌナズナの *CBP60g* と 23% 同一であったため、*NtCBP60g* と命名した. *CBP60g* は別の *CBP60* 型転写因子である *SARD1* と共に機能する (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). そこで、タバコの *SARD1* ホモログを単離し、*NtSARD1* と命名した. *NtSARD1* の過剰発現は *NtCBP60g* と同様に SA 合成を誘導した. また、ベンサミアナタバコの *NtCBP60g* と *NtSARD1* のホモログの発現を VIGS で抑制したところ、両方のホモログを抑制した場合にのみジャガイモ疫病菌由来のエリシターである *INF1* (Kamoun *et al.*, 1997) により誘導される SA 合成が低下した. これらの結果より、タバコにおいても 2 種類の *CBP60* 型転写因子が SA 合成酵素遺伝子の転写を活性化し、SA 合成を誘導すると考えられた. そこで、*WIPK/SIPK* 抑制体において SA 合成に相関して発現が誘導された遺伝子群の中から、*NtCBP60g* よりも遅く誘導され、低分子化合物を基質とする酵素をコードすると考えられる遺伝子群を抽出した. 各遺伝子のベンサミアナタバコのホモログの発現を VIGS で抑制し、*INF1* による SA 誘導におよぼす影響を調べたところ、ペルオキシソームの β 酸化系の遺伝子 (*NtCNL*, *NtCHD* および *NtKAT1*) および HR のマーカー遺伝子 (*HSR201* と *HSR203J*) が SA 合成に必要なことが明らかになった (Takagi *et al.*, 2022; Kotera *et al.*, 2023). *NtCNL*, *NtCHD* および *NtKAT1* はペチュニアの花弁においてケイ皮酸から安息香酸・補酵素 A (CoA) を合成する一連の酵素 (Widhalm and Dudareva 2015) のホモログであり、実際 *in vitro* において *NtCNL* はケイ皮酸をケイ皮酸 CoA に、*NtCHD* と *NtKAT1* はケイ皮酸・CoA を安息香酸・CoA に変換した. また、蛍光タンパク質を付加した *NtCNL*, *NtCHD* および *NtKAT1* はペルオキシソームに局在した. 一方、*HSR201* と *HSR203J* は安息香酸・CoA とベンジルアルコールを結合する活性 (BEBT 活性) および加水分解活性を持つことがそれぞれ報告されている (Baudouin *et al.*, 1997; D'Auria *et al.*, 2002). 各酵素遺伝子をベンサミアナタバコ葉に単独で過剰発現させたところ、*NtCNL* のみが SA の蓄積を誘導した. 一方、*HSR201* は単独では SA の蓄積を誘導しなかったが、*NtCNL* と一緒に発現させたところ、*NtCNL* による SA 誘導を増強した. また、*NtCNL1* による SA 誘導は、*HSR201* と一緒に発現させた場合のみ、

NtCHD・*NtKAT1* との共発現により増強された。これらの結果より、*NtCNL* がペルオキシソーム内で SA 合成を開始する鍵酵素であるのに対し、*HSR201* はペルオキシソームの β 酸化系の下流で働く第二の鍵酵素であると考えられた (図 1, Kotera *et al.*, 2023).

5. 他の植物種における SA 合成へのペルオキシソームの β 酸化系の関与

イネは恒常的にシロイヌナズナやタバコの 100 倍程度の SA を蓄積している。最近、この高レベルの SA が *OsAIM1* (*NtCHD* ホモログ) の変異により顕著に減少するが、*ICS* 遺伝子の変異には影響を受けないことが報告された (Xu *et al.*, 2023)。そのため、イネにおいても、タバコと同様にペルオキシソームの β 酸化系を介して SA が合成されると考えられた。シロイヌナズナにおいては、葉におけるストレスに応答した SA は基本的に *ICS* 経路により合成されるが、種子中の SA が *AIM1* (*NtCHD* ホモログ) および *BZO1* (*NtCNL* ホモログ) の変異により減少することが報告されている (Bussell *et al.*, 2014)。そのため、シロイヌナズナにおいても種子中の SA 合成にはペルオキシソームの β 酸化系が関与する可能性がある。しかしながら、シロイヌナズナには *BEBT* 活性を持つ酵素が存在しないことが示唆されており (D'Auria *et al.*, 2002)、シロイヌナズナの種子における SA 合成機構がタバコ葉における SA 合成機構と類似しているかは不明である。ポプラの葉およびペチュニアの花においては、サリチル酸メチルの揮発量が 2 種類の *CNL* 遺伝子 (ポプラ) あるいは *KAT1* 遺伝子 (ペチュニア) の抑制により減少することが報告されている (Lackus *et al.*, 2021; Van Moerkercke *et al.*, 2009)。しかしながら、どちらの研究においても、SA そのものに対する影響は報告されていない。

6. おわりに

これまでの研究より、シロイヌナズナでは主に *ICS* 経路で、タバコ、ベンサミアナタバコおよびイネでは主に *PAL* 経路で SA が合成されると考えられた。筆者らはシロイヌナズナの *ICS1* が、タバコ、ベンサミアナタバコおよびイネの *ICS* よりも遙かに高い活性を持つことを明らかにしており (Yokoo *et al.*, 2018)、*ICS* の機能性と SA 合成への関与の間には関係があるのかもしれない。シロイヌナズナの *ICS* 経路の *PBS3* と *EPS1* に対応する遺伝子は、アブラナ科植物にしか存在しない可能性がある。他の植

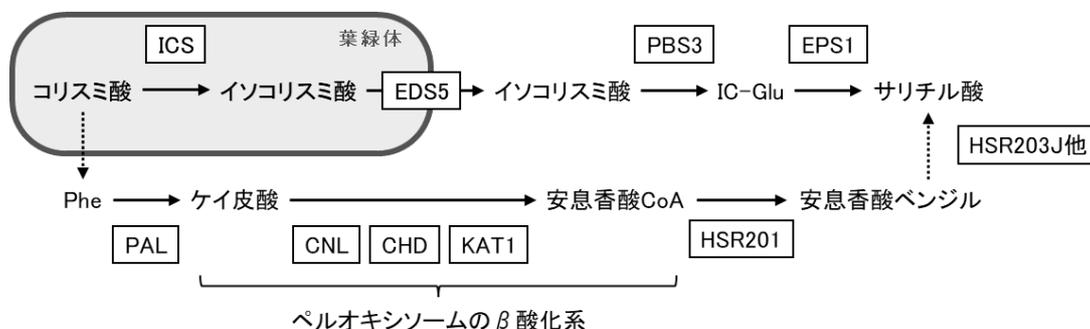


図1. シロイヌナズナの *ICS* 経路と推定上のタバコの SA 合成経路。IC-Glu: isochorismate-9-glutamate.

物種においても、シロイヌナズナの ICS 経路あるいは筆者らが想定するタバコの SA 合成経路に似た経路で SA が合成されるのかどうか今後の展開が待たれる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、WIPK/SIPK 抑制タバコの種子をはじめとした各種実験材料および貴重なご助言を頂いた瀬尾茂美博士、光原一朗博士ならびに大橋祐子博士に最大限の感謝を申し上げます。各種実験材料を分譲してくださった、一瀬勇規博士 (タバコ野火病菌)、David Baulcombe 博士 (pTV00 および pBINTRA6 ベクター) ならびに Sophien Kamoun 博士 (pFB53 ベクター) に心より御礼申し上げます。各種実験の遂行にあたりご助言・補助を頂いた吉岡博文博士、竹本大吾博士、保坂毅博士、下里剛士博士ならびに齋藤勝晴博士に感謝申し上げます。また、本研究の一部は、文部科学省テニユア・トラック普及・定着事業および JSPS 科研費 (JP21880020, JP23688005, JP17K07665 and JP23K05238) の支援で実施された。ここに記して謝意を表します。

引用文献

- Baudouin, E., Charpentreau, M., Roby, D., Marco, Y., Ranjeva, R. and Ranty, B. (1997). Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase family. Esterase activity towards short chain dinitrophenyl acylesters. *Eur. J. Biochem.* 248:700-706.
- Bussell, J.D., Reichelt, M., Wiszniewski, A.A., Gershenzon, J. and Smith, S.M. (2014). Peroxisomal ATP-binding cassette transporter COMATOSE and the multifunctional protein ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM are required for the production of benzoylated metabolites in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol.* 164:48-54.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E. and Métraux, J.-P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett.* 582:473-478.
- Coquoz, J.-L., Buchala, A. and Métraux, J.-P. (1998). The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol.* 117:1095-1101.
- D'Auria, J.C., Chen, F. and Pichersky, E. (2002). Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* 130:466-476.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P. and Métraux, J.-P. (2008). Characterization and biological function of the *ISOCHORISMATE SYNTHASE2* gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 147:1279-1287.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323-329.

- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G.A.A. and Govers, F. (1997). A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:13-20.
- Katou, S., Asakura, N., Kojima, T., Mitsuhashi, I. and Seo, S. (2013). Transcriptome analysis of WIPK/SIPK-suppressed plants reveals induction by wounding of disease resistance-related genes prior to the accumulation of salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* 54:1005-1015.
- Kotera, Y., Komori, H., Tasaki, K., Takagi, K., Imano, S. and Katou, S. (2023). The peroxisomal β -oxidative pathway and benzyl alcohol *O*-benzoyltransferase HSR201 cooperatively contribute to the biosynthesis of salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* 64:758-770.
- Lackus, N.D., Schmidt, A., Gershenzon, J. and Köllner, T.G. (2021). A peroxisomal β -oxidative pathway contributes to the formation of C6-C1 aromatic volatiles in poplar. *Plant Physiol.* 186:891-909.
- León J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M.A. and Raskin, I. (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10413-10417.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. and Raskin, I. (1990). Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A.J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8:203-212.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M, Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.
- Ogawa, D., Nakajima, N., Seo S., Mitsuhashi, I., Kamada, H. and Ohashi, Y. (2006). The phenylalanine pathway is the main route of salicylic acid biosynthesis in *Tobacco mosaic virus*-infected tobacco leaves. *Plant Biotechnol.* 23:395-398.
- Okrent, R.A., Brooks, M.D. and Wildermuth, M.C. (2009). *Arabidopsis* GH3.12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate. *J. Biol. Chem.* 284:9742-9754.
- Pallas, J.A., Paiva, N.L., Lamb, C. and Dixon, R.A. (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant J.* 10:281-293.
- Peng, Y., Yang, J., Li, X. and Zhang, Y. (2021). Salicylic acid: biosynthesis and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 72:761-791.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. and Baulcombe, D.C. (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* 25:237-245.
- Rekhter, D., Lüdke, D., Ding, Y., Feussner, K., Zienkiewicz, K., Lipka, V., Wiermer, M., Zhang, Y. and Feussner, I. (2019). Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science* 365:498-502.

- Seo, S., Katou, S., Seto, H., Gomi, K. and Ohashi, Y. (2007). The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *Plant J.* 49:899-909.
- Shibata, Y., Kawakita, K. and Takemoto, D. (2010). Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:1130-1142.
- Sun, T., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, Q., Ding, Y. and Zhang, Y. (2015). ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity. *Nat Commun.* 6:10159.
- Takagi, K., Tasaki, K., Komori, H. and Katou, S. (2022). Hypersensitivity-related genes *HSR201* and *HSR203J* are regulated by calmodulin-binding protein 60-type transcription factors and required for pathogen signal-induced salicylic acid synthesis. *Plant Cell Physiol.* 63:1008-1022.
- Torrens-Spence, M.P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C.M., Pluskal, T., Shen, A. and Weng, J.K. (2019). PBS3 and EPS1 complete salicylic acid biosynthesis from isochorismate in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 12:1577-1586.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S. and Bender, C.L. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:955-965.
- Van Moerkercke, A., Schauvinhold, I., Pichersky, E., Haring, M.A. and Schuurink, R.C. (2009). A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *Plant J.* 60:292-302.
- Wang, L., Tsuda, K., Truman, W., Sato, M., Nguyen le, V., Katagiri, F. and Glazebrook, J. (2011). CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. *Plant J.* 67:1029-1041.
- White, R.F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99:410-412.
- Wildermuth, M., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414:562-565.
- Widhalm, J.R. and Dudareva, N. (2015). A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. *Mol. Plant* 8:83-97.
- Xu, L., Zhao, H., Wang, J., Wang, X., Jia, X., Wang, L., Xu, Z., Li, R., Jiang, K., Chen, Z., Luo, J., Xie, X. and Yi, K. (2023). AIM1-dependent high basal salicylic acid accumulation modulates stomatal aperture in rice. *New Phytol.* 238:1420-1430.
- Yokoo, S., Inoue, S., Suzuki, N., Amakawa, N., Matsui, H., Nakagami, H., Takahashi, A., Arai, R. and Katou, S. (2018). Comparative analysis of plant isochorismate synthases reveals structural mechanisms underlying their distinct biochemical properties. *Biosci. Rep.* 38:BSR20171457.
- Zhang, C., Zhang, L., Wang, D., Ma, H., Liu, B., Shi, Z., Ma, X., Chen, Y. and Chen, Q. (2018).

- Evolutionary history of the glycoside hydrolase 3 (GH3) family based on the sequenced genomes of 48 plants and identification of Jasmonic acid-related GH3 proteins in *Solanum tuberosum*. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1850.
- Zhang, S. and Klessig, D.F. (2000). Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. *Results Probl. Cell Differ.* 27:65-84.
- Zhang, Y., Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y.T., He, J., Gao, M., Xu, F., Li, Y., Zhu, Z., Li, X. and Zhang, Y. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:18220-18225.
- Zheng, Z., Qualley, A., Fan, B., Dudareva, N. and Chen, Z. (2009). An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity. *Plant J.* 57:1040-1053.

活性酸素シグナルによる植物免疫応答の分子機構

吉岡 博文*・日野 雄太*・岡本 溪太*・稲田 太一*・小川 尊也*・安達 広明**・吉岡 美樹*

Yoshioka, H., Nino, Y., Okamoto, K., Inada, T., Ogawa, T., Adachi, H., and Yoshioka, M.

Molecular mechanisms of plant immune system conferred by ROS signaling.

Abstract

Plants show two-step immune responses, pattern-triggered immunity (PTI), followed by effector-triggered immunity (ETI). Recent studies have shown that immune signaling networks facilitate defense responses through receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK), mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades and calcium-dependent protein kinase (CDPK). Pathogen-induced reactive oxygen species (ROS) burst is mainly caused by activation of a plasma membrane-localizing NADPH oxidase, designated as RBOH (respiratory burst oxidase homolog). In *Nicotiana benthamiana* leaves, NbRBOHB confers rapid and transient PTI-ROS burst and massive and robust ETI-ROS burst, respectively. The long-lasting MAPK activity during ETI triggers the ROS burst mediated by the NbRBOHB, also results in generation of ROS by chloroplasts in a light-dependent manner. Mining of H₂O₂ receptors, ROS sensor proteins seems important to elucidate the ROS-dependent various cellular events. We introduce how ROS sensor proteins are oxidized by H₂O₂, transducing the ROS signaling to the downstream.

Key words: CDPK, MAPK, NADPH oxidase, Plant immunity, RBOH, ROS sensor

* 名古屋大学大学院生命農学研究科 植物免疫学研究室 Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University (*Corresponding author: hyoshiok@agr.nagoya-u.ac.jp)

** 京都大学農学研究科 栽培植物起原学分野 Graduate School of Agriculture, Kyoto University

1. はじめに

植物免疫は、病原体の構成成分である病原体関連分子パターン (PAMPs) とパターン認識受容体との相互作用によって誘導される pattern-triggered immunity (PTI) と、抵抗性タンパク質 (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing receptor ; NLR) による病原体エフェクターの認識によって誘導される effector-triggered immunity (ETI) に分類することができる (Jones and Dangl, 2006). PTI と ETI において、病原体の攻撃に応答して活性酸素種 (ROS) の急速な産生が誘導される (Doke, 1983). ROS バーストは、局所的および全身的な防御反応における免疫シグナルとして重要な役割を果たしている (Doke, 1983; Park *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2012; Gilroy *et al.*, 2014). ROS は、主に細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼである RBOH (respiratory burst oxidase homolog) によって産生される (Kobayashi *et al.*, 2007; Asai *et al.*, 2013).

RBOHの転写と活性化の制御は、免疫応答を中心に解析されてきた。ETIにおいては、MAPKの活性化を介したRBOHの転写誘導が、免疫応答におけるROSの生成増加に関与していることを示してきた (Torres *et al.*, 2002; Yoshioka *et al.*, 2003; Asai *et al.*, 2008; Adachi *et al.*, 2015). *Nicotiana benthamiana*では、防御関連MAPKによってリン酸化されるWRKY転写因子が、NbRBOHBの転写活性化を直接制御する (Adachi *et al.*, 2015). しかし、RBOHの高発現だけではROSバーストは誘導されないため、RBOHの転写誘導のみでは免疫シグナルに応答したROS生産の顕著な増加を説明できない (Kobayashi *et al.*, 2007; Asai *et al.*, 2008). その後、RBOH活性はCDPK, RLCK, calcineurin B-like protein/CBL-interacting protein kinase (CBL/CIPK) 複合体など、様々なキナーゼによるリン酸化修飾によって制御されていることが次第に明らかになってきた (Kobayashi *et al.*, 2007; Asai *et al.*, 2008; Kadota *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2019). これらの知見は、リン酸化を介したRBOH活性の制御が、RBOHファミリーに共通して保存されていることを強く示唆している (Adachi and Yoshioka, 2015). 最近の研究では、葉緑体ROSバーストもまた、ETIにおけるHR細胞死に極めて重要な役割を果たしていることが示されている (Tognetti *et al.*, 2006; Zurbriggen *et al.*, 2009; Su *et al.*, 20018). しかし、植物免疫応答におけるこれらROSバーストの下流シグナル伝達については、明らかになっていない。

本総説では、ROS産生の分子基盤と、ROSシグナル伝達に関与するタンパク質であり、PTIおよびETIにおいて酸化翻訳後修飾されるROSセンサータンパク質の役割を紹介する。

2. MAPK は ETI において NADPH オキシダーゼによる ROS バーストを活性化する

MAPK カスケードは、PTI と ETI に共通する重要なリン酸化反応系であり、MAPKKK, MAPKK, MAPK の 3 つのプロテインキナーゼから構成される。MAPKKK はリン酸化などによってMAPKKを活性化し、次にMAPKKはMAPKを活性化する (Yamada *et al.*, 2016). 免疫応答に関与するMAPKカスケードを増強することで、強固な免疫応答が誘導され、多様な病原体が排除される (Yamamizo *et al.*, 2006). タバコのSIPK/WIPK/NTF6やシロイヌナズナのMPK6/MPK3/MPK4は、防御応答に関与する主要なMAPKとして知られている (Ishihama *et al.*, 2011; Ishihama and Yoshioka, 2012).

N. benthamiana のNbRBOHB遺伝子は、ジャガイモ疫病病原体のエフェクターであるAVR3aとそれに対応するNLRタンパク質R3aを介したETIシグナルによって顕著に誘導

される。細胞死を誘導しない flg22, または PAMP に属するが細胞死に代表される ETI 様の反応を誘導する INF1 で植物を処理した場合, *NbRBOHB* 遺伝子は INF1 で著しく誘導されるが, flg22 ではわずかに誘導されたのみであった (Adachi *et al.*, 2015). INF1 と AVR3a/R3a によって誘導される *NbRBOHB* プロモーター活性は, SIPK に依存することが示された。 *N. benthamiana* では, WRKY 型転写因子である NbWRKY8 を SIPK の基質として同定した (Katou *et al.*, 2005; Ishihama *et al.*, 2011). さらに, Ser または Thr に Pro が続く SP クラスター (SP または TP) を含む 9 つの NbWRKY cDNA を *in silico* で同定した。これらのうち, NbWRKY7, 8, 9, 11 を同時にサイレンシングすると, INF1 または AVR3a/R3a によって誘導される *NbRBOHB* プロモーター活性が著しく低下した。さらに, これら 4 つの WRKY は, *NbRBOHB* プロモーターに存在する WRKY 転写因子のコアシスエレメントである W-box に直接結合する (Adachi *et al.*, 2015).

以上のように, MAPK を介した ROS 産生は, ETI シグナルに支配されているようである。しかしながら, PTI と ETI の間のクロストークに関する最近の知見では, シロイヌナズナの *AtRBOHD* 遺伝子が ETI で誘導されるにもかかわらず, PTI が完全な ETI-ROS バーストに不可欠であることが示された。このことは, ETI における RBOH の活性化には翻訳後修飾が必要であることを示唆している (Yuan *et al.*, 2021). 完全な PTI 応答に対する ETI の必要性についても同様である (Ngou *et al.*, 2021). 実際, *NbRBOHB* を介した ETI-ROS バーストに関する解析では, アグロバクテリウムを介した AVR3a/R3a の発現が PTI を増強し, 強固な ROS バーストをもたらした (Adachi *et al.*, 2015). 興味深いことに, INF1 タンパク質も *NbRBOHB* 遺伝子を強く誘導し, ETI 応答と同様の ROS バーストを引き起こした。このことは, INF1 は *N. benthamiana* において, PTI と ETI 双方の応答を誘導することを示唆している (Domazakis *et al.*, 2018).

PTI-ROS バーストは, CDPK, RLCK, CBL/CIPK によるリン酸化によって制御され, 一方, ETI-ROS バーストは MAPK-WRKY によって誘導される *NbRBOHB* の転写によって制御される (Yoshioka *et al.*, 2016). NLR によって構築されたレジストソームは, N 末端ドメインを通じて漏斗状の構造を示すことから Ca²⁺チャネルとして機能し, 細胞質への Ca²⁺流入を引き起こすようである (Wang *et al.*, 2019; Adachi *et al.*, 2019; Bi *et al.*, 2021; Jacob *et al.*, 2021). しかし, レジストソームのアダプターである RLCK が, ETI において *AtRBOHD* をリン酸化する可能性も否定できない (Kadota *et al.*, 2019).

3. MAPK は ETI において葉緑体 ROS バーストを誘導する

ROS バーストは PTI と ETI で起こり, いずれも免疫応答において極めて重要な役割を担っている (Chai and Doke, 1987; Yoshioka *et al.*, 2001). PTI では, リン酸化に依存した翻訳後修飾により, 細胞膜の RBOH によって急速な ROS 生成反応が誘導される (Kobayashi *et al.*, 2006; Asai *et al.*, 2013; Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Adachi *et al.*, 2015). 一方, ETI において持続する MAPK カスケードの活性化は (Tsuda *et al.*, 2013), RBOH が生成する ROS がアポプラスト領域に蓄積するだけでなく, 光阻害に起因して葉緑体においても強固な ROS バーストが誘導される (Liu *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2018).

光合成の電子伝達系には, いくつかの ROS 発生ポイントが存在する。光化学系 II (PSII) では, 基底状態の酸素分子 (³O₂) の励起によって一重項酸素 (¹O₂) が生成され, 光化学

系 I (PSI) ではスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が生成される (Miyake and Yokota, 2000; Telfer, 2014). O_2^- の生成は, PSI の還元側で起こる O_2 の 1 電子還元によって開始される (Miyake and Yokota, 2000). 病原菌の攻撃に反応してカルビン・ベンソンサイクルが抑制されることによって生じる過剰の NADPH による還元力は, PSI から光合成系のフェレドキシンに移行すると考えられている (Tognetti *et al.*, 2006; Zurbriggen *et al.*, 2009). 生成された O_2^- は, スーパーオキシドジスムターゼによって速やかに過酸化水素 (H_2O_2) に変換され, H_2O_2 が PSI の鉄硫黄クラスターによって触媒されると, フェントン反応によって反応性の高いヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) が生成される (Sharma *et al.*, 2012). 最近では, PSI のチラコイド膜内で発生した ROS が P700 の光阻害に関与していることも報告されている (Sejima *et al.*, 2014, 2016; Takagi *et al.*, 2016). 病原菌のエフェクターの中には, 光阻害を誘導する能力を持つものも報告されている (Rodríguez-Herva *et al.*, 2012; de Torres Zabala *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2019).

葉緑体で生成される ROS の一つである H_2O_2 と免疫応答の関連が報告されている. 葉緑体の H_2O_2 消去系には, アスコルビン酸ペルオキシダーゼ経路とペルオキシレドキシシン経路がある. 葉緑体における ROS 消去系の重要な因子である NADPH 依存性チオレドキシシン還元酵素 C (NTRC) を抑制すると, 葉緑体 ROS バーストと HR 細胞死が促進される (Ishiga *et al.*, 2012, 2016). シアノバクテリア由来のフラボドキシンで形質転換したタバコでは, フェレドキシンが介在する O_2^- 産生が抑制され, HR 細胞死と細菌病原体に対する抵抗性が抑制される (Tognetti *et al.*, 2006; Zurbriggen *et al.*, 2009). Flg22 によって誘導されるサリチル酸蓄積や多くの遺伝子発現は, 光依存的な電子伝達系によって制御されることが報告されている (Sano *et al.*, 2014). PTI では, 葉緑体から核へのレトログレードシグナル (逆行性シグナル) が注目されており, 葉緑体の CAS (カルシウム結合タンパク質) が 1O_2 に関連した核の転写変化を制御することが報告されている (Nomura *et al.*, 2012). また, ホスファターゼ SAL1 によって制御される PAP (3-ホスホアデノシン 5-リン酸) を介した逆行性シグナル伝達が, 細菌病原体に対する抵抗性や, サリチル酸およびジャスモン酸を介したシグナル伝達経路に関与していることが報告された (Ishiga *et al.*, 2017). 最近, ストロミュールと呼ばれる管状構造が葉緑体から核へと伸長し, H_2O_2 の輸送に関与することが報告された (Caplan *et al.*, 2015). また, 葉緑体が核の周辺に集まることも見出されている (Kumar *et al.*, 2018). さらに, 葉緑体の H_2O_2 は, 葉緑体や RBOH で生成される ROS に依存して, 核に移動する可能性がある (Exposito-Rodriguez *et al.*, 2017; Ding *et al.*, 2019). 以上のように, 核に蓄積した H_2O_2 は, 植物と病原体の相互作用において重要な役割を果たしていると考えられる. しかし, 核における H_2O_2 の標的因子は不明である.

4. 免疫応答における活性酸素シグナル伝達経路における ROS センサータンパク質の役割

RBOH および葉緑体で生成された ROS は, 植物免疫応答のシグナル分子として機能すると思われる. ROS シグナルがどのように免疫応答を活性化するのか, その詳細はまだ明らかではない. 比較的安定な H_2O_2 は, ROS センサータンパク質の酸化的な翻訳後修飾によってシグナル伝達を仲介することが知られている. H_2O_2 はタンパク質のシステイン残基のチオール基 (-SH) をスルフェニル化し, スルフェン酸 (-SOH) を生成する (Dumont and Rivoal, 2019). スルフェン酸は非常に不安定であるため, 直ちに分子内あるいは分子間でジ

スルフィド結合 (-S-S-), あるいは還元型グルタチオン (GSH) と S-グルタチオン (-S-SG) を形成する. あるいは, スルフェン酸はさらに酸化されて, スルフィン酸 (-SO₂H) と不可逆的なスルホン酸 (-SO₃H) を形成する. これらの修飾は, ROS センサータンパク質のコンフォメーション変化を引き起こし, さまざまな応答を引き起こすことが知られている (D'Autréaux *et al.*, 2007). 最近の研究によると, 灰色かび病菌に応答する *N. benthamiana* のシステインの酸化的翻訳後修飾のプロテオーム解析 (スルフェノーム解析) により, 183 個のスルフェニル化タンパク質候補が同定された (Wang *et al.*, 2022). いくつかの候補遺伝子を抑制すると, 灰色かび病菌に対する抵抗性が低下することが確認された. HPCA1 は細胞外 H₂O₂ の受容体として同定され, シロイヌナズナの気孔閉鎖に必要なガード細胞の Ca²⁺ チャンネルの H₂O₂ 誘導活性化を媒介する (Wu *et al.*, 2020). HPCA1 はまた, キノンシグナル伝達を仲介し, 細菌病原体感染に対する抵抗性を付与する (Laohavisit *et al.*, 2020).

RBOH 由来の ROS バーストによってアポプラスト領域に蓄積した H₂O₂ は, 細胞膜に局在するアクアポリンを介して細胞内へと流入することが知られている. シロイヌナズナの AtPIP1;4 は, RBOHD 由来の H₂O₂ の細胞内への流入に関与し, 防御関連遺伝子の発現を含む様々な免疫応答を誘導する (Tian *et al.*, 2016). また, コムギのアクアポリンである TaPIP2;10 は H₂O₂ 依存的にリン酸化され, H₂O₂ の細胞内への流入を促進する (Lu *et al.*, 2022). さらに, TaPIP2;10 を介した H₂O₂ の流入は, 防御関連 MAPK の活性化に関与するようである (Wang *et al.*, 2021). これらアクアポリンは, RBOH 依存的な免疫応答に必要であり, アクアポリン近傍の細胞内領域に ROS センサーが存在することを示唆するものと思われる.

システインのチオール基は, 過硫化合物 (-SSH) または多硫化合物 (-SSnH, n≥1) として側鎖に硫黄原子が過剰に挿入されて合成され, それぞれ過酸化システイン (Cys-SSH) および多硫化合物システイン (Cys-SSnH, n≥1) を形成することが報告されている (Ida *et al.*, 2014; Sawa *et al.*, 2022). これらシステイン誘導体は, 大腸菌や哺乳類に豊富に存在し (Akaike *et al.*, 2017), 細胞内で抗酸化作用を発揮する (Sawa *et al.*, 2022). さらに, チオール基は解離してチオレートアニオン (-S⁻) を形成することで, スルフェニル化されやすい性質を示す (Gupta and Carroll, 2014). チオール基と同様に, -SSH や -SSnH も H₂O₂ によって酸化され, スルフェン酸を形成する (Akaike *et al.*, 2017). -SSH や -SSnH はチオール基と比較して求核性が高く, pKa 値が低いため, H₂O₂ と高い反応性を示す (Heppner *et al.*, 2018). これらの知見から, 過酸化・多硫化合物システインを含む ROS センサータンパク質は, 免疫応答による細胞内外の環境変化を伴って生産される H₂O₂ によって高度に酸化されるものと考えられる.

シロイヌナズナでは, Cys-SH から Cys-SSH を生産する過酸化因子として硫化水素 (H₂S) が注目されている (Aroca *et al.*, 2018). 細胞質基質の H₂S は, L-システイン脱硫酵素 1 (DES1) によって L-システインから生成され, 病原体に対する抵抗性を正に制御している (Vojtović *et al.*, 2021). スルフェノーム解析から, Cys-SSH は一酸化窒素 (NO) による S-ニトロシル化修飾も受けることが示された (Aroca *et al.*, 2017). さらに, アブシジン酸による気孔閉鎖過程において, シロイヌナズナの AtRBOHD は DES1 由来の H₂S によって過酸化され, ROS 産生が亢進される (Shen *et al.*, 2020). 一方で, RBOH と DES1 の過酸化システインの酸化がチオレドキシニンによって還元されることで Cys-SH となり, RBOH と DES1 が抑制され, 負のフィードバックが形成されると予想されている (Shen *et al.*, 2020). これらの報告は, システインの過酸化・多硫化合物, および過酸化・多硫化合物システインを含む

ROS センサータンパク質の酸化・還元が、ROS を介した免疫応答の重要なイベントであることを示している。

5. 最後に

本総説では、ETIにおけるMAPKカスケードによるRBOH媒介および葉緑体ROSバーストの制御メカニズムに関する最近の進展を紹介した。これらの強固なROSバーストは、細胞死を含む様々な免疫応答を引き起こす。しかし、これらのROSが、免疫応答だけでなく、気孔閉鎖 (Kwak *et al.*, 2003), 細胞伸長 (Foreman *et al.*, 2003), 根毛形成 (Takeda *et al.*, 2008), 花粉管伸長 (Kaya *et al.*, 2014), イネの根における通気組織形成 (Yamauchi *et al.*, 2017) など、さまざまな細胞応答をどのように制御しているのか、その制御メカニズムは不明である。これらの疑問に答える鍵は、H₂O₂を受け取り、下流のシグナル経路を伝達するROSセンサータンパク質を同定・解析することにあると思われる。近い将来、ROSセンサー研究は植物免疫応答を含め、多種多様なROSによる細胞応答制御に関わるプロセスに新たな知見を与えてくれるだろう。

謝辞

本研究は、名古屋大学大学院生命農学研究科 植物免疫学研究室諸氏の協力のもとに行われました。また、名古屋大学道家紀志名誉教授、センズベリーラボラトリーのSophien Kamoun 博士、Jonathan Jones 博士には多大なご支援を賜りました。ここに記して感謝の意を表します。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費の補助を受けて行いました。

引用文献

- Adachi, H., Contreras, M., Harant, A., Wu, C.H., Derevnina, L., Sakai, T., Duggan, C., Moratto, E., Bozkurt, T.O., Maqbool, A., Win, J. and Kamoun, S. (2019) An N-terminal motif in NLR immune receptors is functionally conserved across distantly related plant species. *elife* 8:1-31.
- Adachi, H., Nakano, T., Miyagawa, N., Ishihama, N., Yoshioka, M., Katou, Y., Yaeno, T., Shirasu, K. and Yoshioka, H. (2015) WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 27:2645-2663.
- Adachi, H. and Yoshioka, H. (2015) Kinase-mediated orchestration of NADPH oxidase in plant immunity. *Brief. Funct. Genomics* 14:253-259.
- Akaike, T., Ida, T., Wei, F.Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M.M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., Inaba, K., Shima, H., Tanuma, N., Jung, M., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J.M. and Motohashi, H. (2017) Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.* 8:1177.
- Aroca, A., Benito, J.M., Gotor, C. and Romero, L.C. (2017) Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 68:4915-4927.
- Aroca, A., Gotor, C. and Romero, L.C. (2018) Hydrogen sulfide signaling in plants: emerging roles of protein persulfidation. *Front. Plant Sci.* 9:1-8.
- Asai, S., Ichikawa, T., Kobayashi, M., Nomura, H., Kamiyoshihara, Y., Mori, H., Kadota, Y., Zipfel, C., Jones, J.D.G. and Yoshioka, H. (2013) The variable domain of a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) confers subcellular localization and substrate recognition for NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*

288:14332-14340.

- Asai, S., Ohta, K. and Yoshioka, H. (2008) MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20:1390-1406.
- Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y., Dang, S., Xu, J., Hu, M., Wang, J., Zou, M., Deng, Y., Li, Q., Huang, S., Li, J., Chai, J., He, K., Chen, Y.H. and Zhou, J.M. (2021) The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell* 184:3528-3541.
- Caplan, L.J., Kumar, S.A., Park, E., Padmanabhan, S.M., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K. and Dinesh-Kumar, P.S. (2015) Chloroplast stromules function during innate immunity. *Dev. Cell* 34:1-13.
- Chai, H.B. and Doke, N. (1987) Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitively to *Phytophthora infestans* by cytospor germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:27-37.
- D'Autréaux, B. and Toledano, M.B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:813-824.
- de Torres Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bölter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnov, N. and Grant, M. (2015) Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nat. Plants* 1:15074.
- Ding, X., Jimenez-Gongora, T., Krenz, B. and Lozano-Duran, R. (2019) Chloroplast clustering around the nucleus is a general response to pathogen perception in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* 20:1298-1306.
- Doke, N. (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23:345-357.
- Domazakis, E., Wouters, D., Visser, R.G.F., Kamoun, S., Joosten, M.H. A.J., and Vleeshouwers, V.G.AA. (2018) The ELR-SOBIR1 complex functions as a two-component receptor-like kinase to mount defense against *phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31:795-802.
- Dumont, S. and Rivoal, J. (2019) Consequences of oxidative stress on plant glycolytic and respiratory metabolism. *Front. Plant Sci.* 10:166-182.
- Exposito-Rodriguez, M., Laissue, P.P., Yvon-Durocher, G., Smirnov, N. and Mullineaux P.M. (2017) Photosynthesis-dependent H₂O₂ transfer from chloroplasts to nuclei provides a high-light signalling mechanism. *Nat. Commun.* 8:49.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M. and Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.G., Toyota, M., Devireddy, A.R. and Mittler, R. (2014) A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* 19:623-630.
- Gupta, V. and Carroll, K.S. (2014) Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840:847-875.
- Han, J.P., Köster, P., Drerup, M.M., Scholz, M., Li, S., Edel, K.H., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Hippler, M. and Kudla, J. (2019) Fine-tuning of RBOHF activity is achieved by differential phosphorylation and Ca²⁺ binding. *New Phytol.* 221:1935-1949.
- Heppner, D.E., Hristova, M., Ida, T., Mijuskovic, A., Dustin, C.M., Bogdándi, V., Fukuto, J.M., Dick, T.P., Nagy, P., Li, J., Akaike, T. and van der Vliet, A. (2018) Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling? *Redox Biol.* 14:379-385.
- Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M. and Akaike, T.

- (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:7606-7611.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Ikeda, Y., Matsuura, T. and Mysore, K.S. (2016) NADPH-dependent thioredoxin reductase C plays a role in nonhost disease resistance against *Pseudomonas syringae* pathogens by regulating chloroplast-generated reactive oxygen species. *Peer J.* 4:e1938.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Wangdi, T., Mysore, K.S. and Uppalapati, S.R. (2012) NTRC and chloroplast-generated reactive oxygen species regulate *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* disease development in tomato and *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:294-306.
- Ishiga, Y., Watanabe, M., Ishiga, T., Tohge, T., Matsuura, T., Ikeda, Y., Hoefgen, R., Fernie, A.R. and Mysore, K.S. (2017) The SAL-PAP chloroplast retrograde pathway contributes to plant immunity by regulating glucosinolate pathway and phytohormone signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30:829-841.
- Ishihama, N., Yamada, R., Yoshioka, M., Katou, S. and Yoshioka, H. (2011) Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell* 23:1153-1170.
- Ishihama, N. and Yoshioka, H. (2012) Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:431-437.
- Jacob, P., Kim, N.H., Wu, F., El-Kasmi, F., Chi, Y., Walton, W.G., Furzer, O.J., A Lietzan, D., Sunil, S., Kempthorn, K., Redinbo, M.R., Pei, Z.M., Wan, L. and Dang, J.L. (2021) Plant "helper" immune receptors are Ca²⁺-permeable nonselective cation channels. *Science* 373:420-425.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kadota, Y., Liebrand, T.W.H., Goto, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Menke, F.L.H., Torres, M.A., Molina, A., Zipfel, C., Coaker, G. and Shirasu, K. (2019) Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector- and PAMP-triggered immunity in plants. *New Phytol.* 221:2160-2175.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J. D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A. and Zipfel, C. (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol. Cell* 54:43-55.
- Katou, S., Yoshioka, H., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G., Mori, H. and Doke, N. (2005) Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol.* 139:1914-1926.
- Kaya, H., Nakajima, R., Iwano, M., Kanaoka, M. M., Kimura, S., Takeda, S., Kawarazaki, T., Senzaki, E., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Takayama, S., Abe, M. and Kuchitsu, K. (2014) Ca²⁺-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth. *Plant Cell* 26:1069-1080.
- Kobayashi, M., Kawakita, K., Maeshima, M., Doke, N. and Yoshioka, H. (2006) Subcellular localization of Strboh proteins and NADPH-dependent O₂⁻-generating activity in potato tuber tissues. *J. Exp. Bot.* 57:1373-1379.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N. and Yoshioka, H. (2007) Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19:1065-1080.
- Kobayashi, M., Yoshioka, M., Asai, S., Nomura, H., Kuchimura, K., Mori, H., Doke, N. and Yoshioka, H. (2012) StCDPK5 confers resistance to late blight pathogen but increases susceptibility to early blight pathogen in potato via reactive oxygen species burst. *New Phytol.* 196:223-237.
- Kumar, A.S., Park, E. Nedo, A., Alqarni, A., Ren, L., Hoban, K., Modla, S., McDonald, J.H., Kambhamettu, C., Dinesh-Kumar, S.P. and Caplan, J.L. (2018) Stromule extension along microtubules coordinated with actin-mediated anchoring guides perinuclear chloroplast movement during innate immunity. *elife*.

7:e23625.

- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G. and Schroeder, J.I. (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22:2623-2633.
- Laohavisit, A., Wakatake, T., Ishihama, N., Mulvey, H., Takizawa, K., Suzuki, T. and Shirasu, K. (2020) Quinone perception in plants via leucine-rich-repeat receptor-like kinases. *Nature* 587:92-97.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W. and Zhang, S. (2007) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J.* 51:941-954.
- Lu, K., Chen, X., Yao, X., An, Y., Wang, X., Qin, L., Li, X., Wang, Z., Liu, S., Sun, Z., Zhang, L., Chen, L., Li, B., Liu, B., Wang, W., Ding, X., Yang, Y., Zhang, M., Zou, S. and Dong, H. (2022) Phosphorylation of a wheat aquaporin at two sites enhances both plant growth and defense. *Mol. Plant* 15:1772-1789.
- Miyake, C. and Yokota, A. (2000) Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 41:335-43.
- Ngou, B.P.M., Ahn, H.K., Ding, P. and Jones, J.D.G. (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592:110-115.
- Nomura, H., Komori, T., Uemura, S., Kanda, Y., Shimotani, K., Nakai, K., Furuichi, T., Takebayashi, K., Sugimoto, T., Sano, S., Suwastika, I. N., Fukusaki, E., Yoshioka, H., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2012) Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 3:926.
- Park, H.-J., Miura, Y., Kawakita, K., Yoshioka, H. and Doke, N. (1998) Physiological mechanisms of a sub-systemic oxidative burst triggered by elicitor-induced local oxidative burst in potato tuber slices. *Plant Cell Physiol.* 39:1218-1225.
- Rodríguez-Herva, J.J., González-Melendi, P., Cuartas-Lanza, R., Antúnez-Lamas, M., Río-Alvarez, I., Li, Z., López-Torrejón, G., Díaz, I., Del Pozo, J.C., Chakravarthy, S., Collmer, A., Rodríguez-Palenzuela, P. and López-Solanilla, E. (2012) A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. *Cell. Microbiol.* 14:669-681.
- Sano, S., Aoyama, M., Nakai, K., Shimotani, K., Yamasaki, K., Sato, M.H., Tojo, D., Suwastika, I.N., Nomura, H. and Shiina, T. (2014) Light-dependent expression of flg22-induced defense genes in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 5:531.
- Sawa, T., Takata, T., Matsunaga, T., Ihara, H., Motohashi, H., and Akaike, T. (2022) Chemical biology of reactive sulfur species: Hydrolysis-driven equilibrium of polysulfides as a determinant of physiological functions. *Antioxid. Redox Signal.* 36:327-336.
- Sejima, T., Hanawa, H., Shimakawa, G., Takagi, D., Suzuki, Y., Fukayama, H., Makino, A. and Miyake, C. (2016) Post-illumination transient O₂-uptake is driven by photorespiration in tobacco leaves. *Physiol. Plant.* 156:227-238.
- Sejima, T., Takagi, D., Fukayama, H., Makino A. and Miyake, C. (2014) Repetitive short-pulse light mainly inactivates photosystem I in sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.* 55:1184-1193.
- Sharma, P., Jha A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012:217037.
- Shen, J., Zhang, J., Zhou, M., Zhou, H., Cui, B., Gotor, C., Romero, L. C., Fu, L., Yang, J., Foyer, C. H., Pan, Q., Shen, W., and Xie, Y. (2020) Persulfidation-based modification of cysteine desulfhydrase and the NADPH oxidase RBOHD controls guard cell abscisic acid signaling. *Plant Cell* 32:1000-1017.
- Su, J., Yang, L., Zhu, Q., Wu, H., He, Y., Liu, Y., Xu, J., Jiang, D. and Zhang, S. (2018) Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity. *PLoS Biol.* 16:e2004122.
- Takagi, D., Takumi, S., Hashiguchi, M., Sejima, T. and Miyake, C. (2016) Superoxide and singlet oxygen

- produced within the thylakoid membranes both cause photosystem I photoinhibition. *Plant Physiol.* 171:1626-1634.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K. and Dolan, L. (2008) Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319:1241-1241.
- Telfer, A. (2014) Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of β -carotene. *Plant Cell Physiol.* 55:1216-23.
- Tian, S., Wang, X., Li, P., Wang, H., Ji, H., Xie, J., Qiu, Q., Shen, D. and Dong, H. (2016) Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. *Plant Physiol.* 171:1635-1650.
- Tognetti, V.B., Palatnik, J.F., Fillat, M. F., Melzer, M., Hajirezaei, M.R., Valle, E.M. and Carrillo, N. (2006) Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance. *Plant Cell* 18:2035-2050.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2002) *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:517-522.
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C.J., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M. and Katagiri, F. (2013) Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 9:e1004015.
- Vojtovič, D., Luhová, L. and Petřivalský, M. (2021) Something smells bad to plant pathogens: Production of hydrogen sulfide in plants and its role in plant defence responses. *J. Adv. Res.* 27:199-209.
- Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H.W., Zhou, J.M. and Chai, J. (2019) Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* 364:eaav5870.
- Wang, Y., Li, G., Chen, T. and Tian, S. (2022) Protein sulfenylation contributes to oxidative burst-triggered responses during the interaction between *Botrytis cinerea* and *Nicotiana benthamiana*. *J. Proteomics* 251:104423.
- Wang, X., Lu, K., Yao, X., Zhang, L., Wang, F., Wu, D., Peng, J., Chen, X., Du, J., Wei, J., Ma, J., Chen, L., Zou, S., Zhang, C., Zhang, M. and Dong, H. (2021) The aquaporin TaPIP2;10 confers resistance to two fungal diseases in wheat. *Phytopathology* 111:2317-2331.
- Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., Wan, D., Ni, J., Yuan, F., Wu, X., Zhang, Y., Wang, L., Ye, R., Byeon, B., Wang, W., Zhang, S., Sima, M., Chen, S., Zhu, M., Pei, J., Johnson, D.M., Zhu, S., Cao, X., Pei, C., Zai, Z., Liu, Y., Liu, T., Swift, G.B., Zhang, W., Yu, M., Hu, Z., Siedow, J.N., Chen, X. and Pei, Z.M. (2020) Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature* 578:577-581.
- Xu, Q., Tang, C., Wang, X., Sun, S., Zhao, J., Kang, Z. and Wang X. (2019) An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function. *Nat. Commun.* 10:5571.
- Yamada, K., Yamaguchi, K., Shirakawa, T., Nakagami, H., Mine, A., Ishikawa, K., Fujiwara, M., Narusaka, M., Narusaka, Y., Ichimura, K., Kobayashi, Y., Matsui, H., Nomura, Y., Nomoto, M., Tada, Y., Fukao, Y., Fukamizo, T., Tsuda, K., Shirasu, K., Shibuya, N. and Kawasaki, T. (2016) The *Arabidopsis* CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *EMBO J.* 35:2468-2483.
- Yamamoto, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J.D.G., Doke, N. and Yoshioka, H. (2006) Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiol.* 140:681-692.
- Yamauchi, T., Yoshioka, M., Fukazawa, A., Mori, H., Nishizawa, N.K., Tsutsumi, N., Yoshioka, H. and Nakazono, M. (2017) An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *Plant Cell* 29:775-790.
- Yoshioka, H., Adachi, H., Nakano, T., Miyagawa, N., Ishihama, N., Asai, S. and Yoshioka, M. (2016)

- Hierarchical regulation of NADPH oxidase by protein kinases in plant immunity. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95:20-26.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G. and Doke, N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15:706-718.
- Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H.-J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K. and Doke, N. (2001) Induction of plant gp91 *phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:725-736.
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J.M., He, S.Y. and Xin, X.F. (2021) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* 592:105-109.
- Zurbriggen, M.D., Carrillo, N., Tognetti, V.B., Melzer, M., Peisker, M., Hause, B. and Hajirezaei, M.R. (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant J.* 60:962-973.

植物の全身を巡る病原体との攻防戦略の解明

舘田知佳*・ドミンゲズ ジョン**・清水元樹**・篠澤章久***・
齋藤宏昌****・西原昌宏**・藤崎恒喜**

Tateda, C., Dominguez, J.J.A., Shimizu, M., Shinozawa, A., Saitoh, H., Nishihara, M.,
and Fujisaki, K.

Elucidation of the mechanisms determining pathogen infectivity during systemic
plant-pathogen fights

Abstract

Plants and pathogens are fighting not only on pathogen-infected leaves but also on non-infected leaves in which pathogens are not detected. Systemic acquired resistance (SAR) is a well-known plant defense system, which is systemically induced during pathogen infection. In contrast, current reports show that primary infection of some fungal or bacterial pathogens systemically induce host's enhanced susceptibility for their next infection, termed as systemic-induced susceptibility (SIS). Here, we found that *Septoria gentianae* systemically induces enhanced susceptibility to gentian plants through the manipulation of the number of host's stomata, which are known entry sites of this fungus. Expression of a fungal effector-like protein, CSEP49 and its gentian homolog led to increased stomatal density in gentian plants, suggesting that CSEP49 could hijack the host mechanism determining stomatal density and accelerates the host stomatal development for the infection of *S. gentianae*. Interestingly, this SIS mechanism was also confirmed in other plant species during bacterial infection. Therefore, we conclude that SIS *via* manipulation of host stomatal density is a common mechanism for several pathogens which enter the host tissues via stomata.

Key words: Gentian, systemic-induced susceptibility (SIS), systemic acquired resistance (SAR), stomata

* 岩手大学農学部 Faculty of Agriculture, Iwate University

** 公益財団法人 岩手生物工学研究センター Iwate Biotechnology Research Center

*** 東京農業大学バイオサイエンス学科 Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture

**** 東京農業大学分子微生物学科 Department of Molecular Microbiology, Tokyo University of Agriculture

はじめに

植物と病原体は、病原体感染にともなう攻防の際に、それぞれの生存に適した環境を構築する手段として種々のシグナル分子を生成・活用している。一度根を下ろすと移動することができず、病原体から逃げられない植物は、自身の環境を変える能力を獲得し、その植物—病原体間の攻防は、感染組織での攻防以外にも植物の全身で繰り広げられている。これまで非感染組織での応答については、植物側が引き起こす抵抗性誘導について多くの研究がなされている。本稿では、これまでの知見とは逆の反応となる、病原菌側が植物を何らかの形で乗っ取ることにより引き起こす非感染葉での感受性誘導現象と、それを誘導する感染葉での攻防について、リンドウとリンドウ葉枯病菌の相互作用に関する研究から見出した内容を基本に、さまざまな植物種での応答についても紹介したい。

1. 病原菌—植物間相互作用における全身での応答

植物が感染組織で病原体の侵入を認識すると、感染組織での局所的な免疫応答の活性化が引き起こされた結果、病原体の存在していない非感染組織にも抵抗性が誘導される現象である全身獲得抵抗性（Systemic acquired resistance；SAR）はよく知られている（Durrant and Dong, 2004；Fu and Dong, 2013）。特に、感染葉で生合成されたサリチル酸（SA）、アゼライン酸（AZA）、ピペコリン酸（L-Pip）などの植物分子が非感染葉へ直接移動した結果、非感染葉では防御応答に関わる遺伝子発現および代謝産物の制御などが引き起こされ、二次感染に対する抵抗性が誘導される（Fu and Dong, 2013；Jung et al., 2009；Lim et al., 2016；Schwachtje et al., 2018）。近年これとは逆に、病原菌感染後に非感染葉に感受性が誘導される現象（Systemic-induced susceptibility；SIS）がシロイヌナズナやコムギで見られている（Cui et al., 2005；Lake and Wade, 2009；Seybold et al., 2020）。しかし、SISを誘導するために働く植物体または病原体由来の因子やその作用機構はほとんどわかっていない。

2. リンドウ葉枯病菌がリンドウの新生葉に SIS を引き起こす

花卉作物のリンドウ（*Gentian L.*）に深刻な病害を引き起こすリンドウ葉枯病菌（*Septoria gentianae*）は、リンドウ葉の気孔から侵入する感染様式を持つ病原糸状菌である。リンドウ葉の向軸面の気孔数はリンドウの品種・系統間で異なり、リンドウ葉枯病菌に対する感受性強度と密接に相関している。植物の気孔形成を促進する STOMAGEN ペプチドを処理したリンドウは、リンドウ葉枯病菌に対する感受性が増強されることから、気孔密度を操作することで、リンドウ葉枯病菌への耐性を人為的に制御可能であると示唆された（Tateda et al., 2019）。実は、このようなリンドウ葉の気孔密度操作はリンドウ葉枯病菌自身によってすでに引き起こされていた。リンドウ葉枯病菌を一部の葉に局所的に接種し、初期感染が成立した植物体において、病原体が存在していない上位葉（新生葉）では気孔密度が増加する。この気孔密度が増加した新生葉は、リン

ドウ葉枯病菌の二次感染に対して対照区と比較して感受性を示した（舘田ら令和4年度日本植物病理学会発表）（図1）。本現象はまさに SIS の一つであると考えられる。一方、角皮侵入を行うリンドウ炭疽病菌（*Colletotrichum acutatum*）接種時には、新生葉での気孔形成は促進されない。気孔侵入するリンドウ葉枯病菌が二次感染時の自身の侵入効率をあげるために上位葉での気孔密度を増加させる動的な感受性誘導を引き起こしている可能性が示唆された。リンドウ葉枯病菌は、リンドウの下位葉から上位葉へ感染を徐々に進展させる生態を持つことから、上記現象は、自然界でも意義のある感染戦略ではないだろうか。

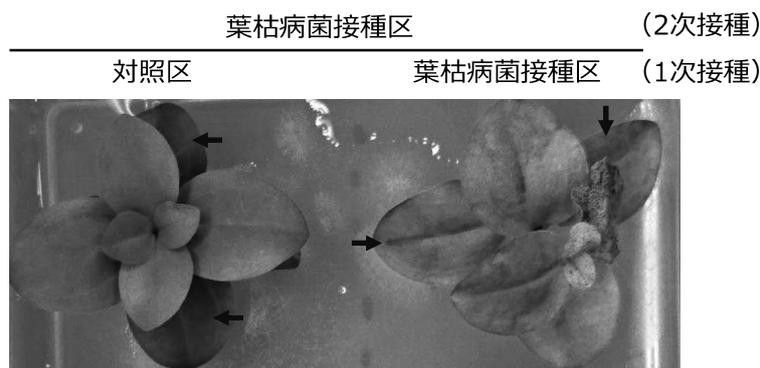


図1 リンドウ葉枯病菌による新生葉での感受性誘導
黒矢印で示した葉にそれぞれ水または孢子懸濁液を接種した（一次接種）。

3. 感染葉で作用するリンドウ葉枯病菌由来因子

では、リンドウ葉枯病菌による SIS は、どのようにして誘導されているのか。リンドウの品種/系統のうち「To 系統」は、葉の向軸面に気孔が全く存在しない系統である（Tateda et al., 2019）。To 系統にリンドウ葉枯病菌を無傷接種しても全く病徴の観察されない強抵抗性を示すが、有傷接種時には、他のリンドウ品種と同様の病徴をとまなう一次感染の成立が確認される。この To 系統の新生葉における気孔形成促進は、リンドウ葉枯病菌を無傷接種した際には誘導されず、有傷接種においてのみ誘導された。このことから、新生葉における気孔形成促進には、リンドウ葉枯病菌の一次感染の成立が必須であり、感染時に発現する病原性因子の関与が示唆された。また、リンドウ葉枯病菌をベンサミアナタバコに接種すると、リンドウで見られるような病徴は生じないものの、新生葉での気孔形成促進は確認される。一方、リンドウ葉枯病菌懸濁液を煮沸処理したものを処理したベンサミアナタバコでは気孔形成促進は見られないことから、やはりエフェクタータンパク質のような生きて菌体から分泌される分子の関与が示唆された。そこで、リンドウ葉枯病菌がリンドウに感染したサンプルのトランスクリプトーム解析から、同菌のエフェクター候補遺伝子（Candidate Secreted Effector Proteins; CSEPs）の同定を試みた。リンドウでの感染成立時に有意に発現が誘導された

CSEPs を、ベンサミアナタバコの一部の葉にアグロバクテリウムを介して一過的に発現させ、新生葉の気孔数を測定することで SIS 誘導に関わる CSEPs を探索した。その結果、少なくとも 2 つの CSEPs がベンサミアナタバコの新生葉に気孔形成を促す効果を示した。2 つの候補因子のうち CSEP49 はペプチドホルモン様タンパク質であったことから、CSEP49 ペプチドをリンドウに与えることで気孔形成促進効果の検証を行った。CSEP49 ペプチドを処理したリンドウの新生葉では、対照区と比較して有意に気孔数が増加していた。この気孔数が増加した植物体にリンドウ葉枯病菌を二次接種すると、対照区と比較してリンドウ葉枯病菌に対する感受性が増加していたことから、リンドウ葉枯病菌由来の CSEP49 がリンドウに SIS を誘導していると結論づけた。

4. CSEP49 と CSEP13 の相違点

リンドウでの感染成立時に有意に発現が誘導された CSEPs のうち、CSEP13 は CSEP49 と同じタンパク質ファミリーをコードしている遺伝子であるが、CSEP13 タンパク質をベンサミアナタバコで一過的に発現しても新生葉での気孔形成促進効果は見られない。一方で、CSEP13 ペプチドおよび CSEP49 ペプチドを添加したリンドウでは、どちらも対照区と比較して根の伸長阻害が引き起こされた (図 2)。

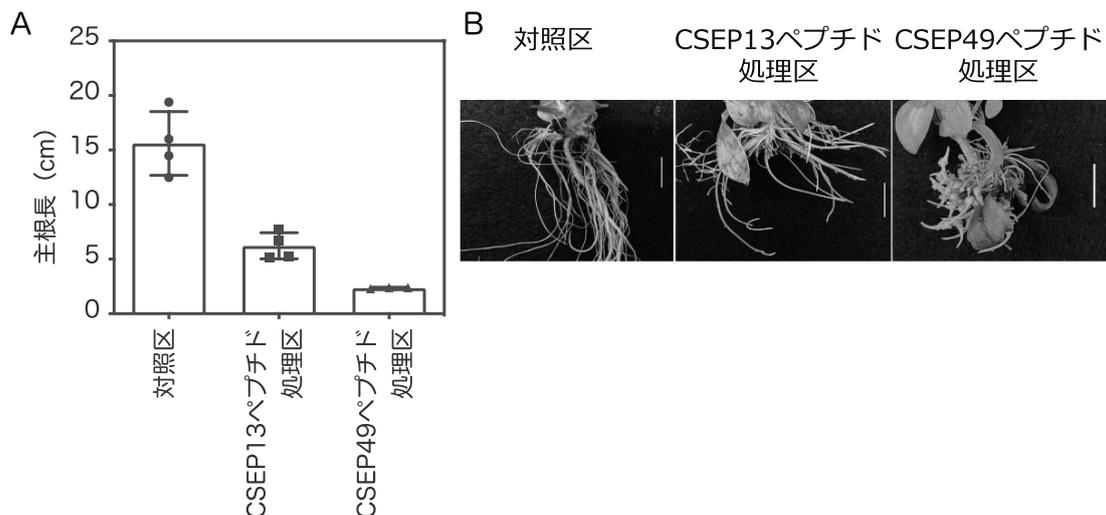


図2 CSEP13ペプチドおよびCSEP49ペプチド処理により根の伸長阻害が生じる
 (A) ペプチド処理後のリンドウの主根長の長さ. (B) 伸長阻害が生じた根の様子.
 Bar=1cm.

ベンサミアナタバコにおける両タンパク質の細胞内局在は異なっていることから (図 3)、CSEP49 と CSEP13 のペプチドとしての一部の機能は類似しているもののペプチドとして分泌されるまでの過程で違いが生じている可能性が考えられた。今後、リンドウ葉枯病菌から分泌される過程での両タンパク質の解析が必要である。

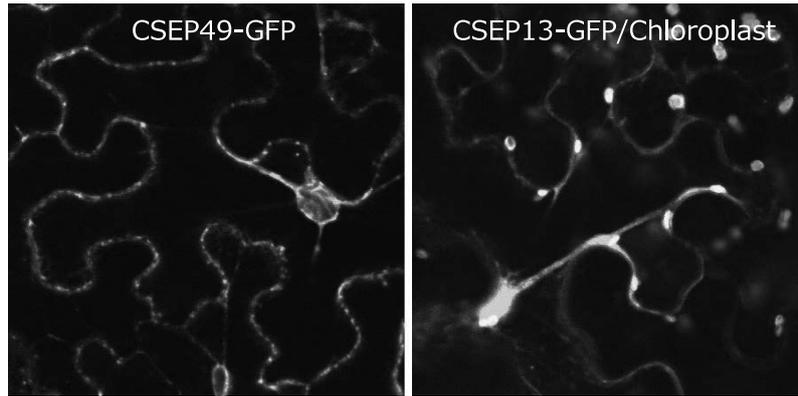


図3 CSEP49およびCSEP13は異なる局在性を示す

5. リンドウ由来の分泌ペプチドによる感受性誘導

CSEP49とCSEP13は植物のペプチドホルモンに相同性を示す因子であったことから、リンドウに保存されているCSEP49様ペプチドの機能を検証した。その結果、少なくとも1種類のリンドウ由来のペプチドが、CSEP49と同様に、リンドウの新生葉で気孔形成促進効果を示した。このことは、CSEP49がリンドウ由来の分泌ペプチドと相同な機能を持ち、そのシステムを乗っ取ることによりSISを誘導していることを示唆している（図4）。

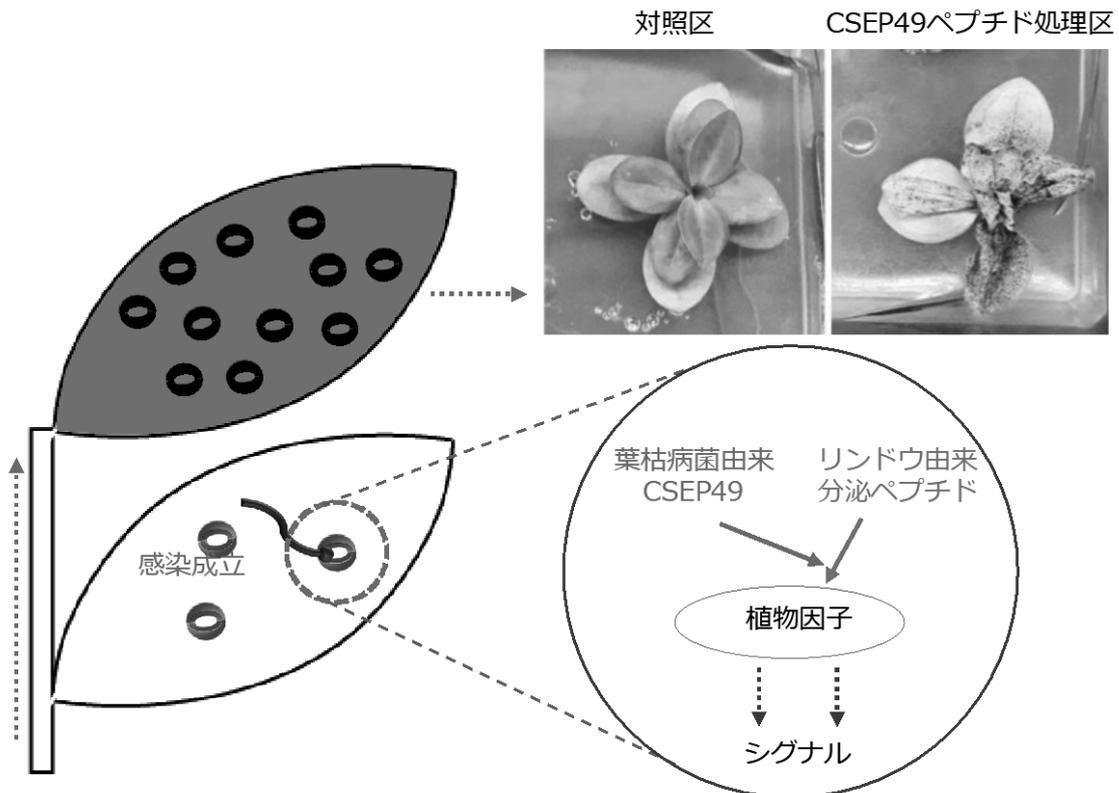


図4 リンドウ葉枯病菌によるリンドウへのSIS誘導

6. 気孔侵入型の病原菌感染時に共通して見られる現象

植物の持つ気孔は、病原体の主要な侵入口の1つであり、細菌や一部糸状菌などの気孔侵入型の病原体にとって、気孔周辺での植物との攻防は、感染の成否を決定する重要な要素となっている。そこで、リンドウ葉枯病菌以外の気孔侵入型の病原菌と植物種の組み合わせで、気孔形成制御を伴う SIS が生じるのかについて調査した。病原細菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 を接種したシロイヌナズナやトマト、*P. syringae* pv. *tabaco* を接種したベンサミアタバコでも新生葉の気孔数が増加し、それぞれの病原菌の二次接種に対する感受性が増加した。さらに、CSEP49 様の植物由来の分泌ペプチドを処理したシロイヌナズナやベンサミアタバコでも対照区と比較して新生葉の気孔数が増加した。これらのことから、植物由来の分泌ペプチドによる気孔形成制御を介した SIS 誘導は、気孔侵入型の病原体と宿主植物との攻防に広く認められる現象であると考えられる。リンドウ葉枯病菌と *Pseudomonas* 属細菌に共通するエフェクターは見られないが、それぞれの病原菌が宿主植物に感染した後に、類似する宿主植物由来の分泌ペプチドの機能を乗っ取ることにより、SIS 誘導を行っているのではないだろうか。

7. SIS 誘導過程の感染葉で発現変動する植物由来因子

次に、感染葉で作用する宿主植物由来の因子として分泌ペプチドが見つかったことから、植物側の SIS 関連因子の探索も試みた。リンドウ葉枯病菌感染時のリンドウのトランスクリプトーム解析の結果、感染後 2、3、5 日目に対照区と比較して有意に発現が上昇または抑制された遺伝子は、それぞれ 5 種類、200 種類以上、1800 種類以上確認された。植物由来の SIS 関連因子も多くが感染成立後に作用していると考えられる。この中には、上記分泌ペプチドに相当する遺伝子も含まれていた。その他、MYB、WRKY 型および bZIP 型の転写因子や、cysteine-rich receptor like kinase、calcium-dependent protein kinase および Leucine-rich receptor-like protein kinase ファミリータンパク質などが多く見られた。これらの感染葉での実際の機能については、今後の解析で明らかにしていきたい。

さらに、シロイヌナズナの SAR 誘導因子 AZI1 (AZELAIC ACID INDUCED 1) (Jung et al., 2009) に相同性を示すリンドウの遺伝子発現が、葉枯病菌感染 3 日後に対照区と比較して有意に増加し、5 日後には減少していた。ここから、SIS 誘導過程においても一過的には SAR 様の反応が誘導されるが、その後何らかの形で当該抵抗性反応が抑制されていると考えられる。

8. 宿主植物の気孔形成依存型 SIS と非依存型 SIS の相違点

ここまで、気孔侵入型の病原菌による宿主植物の気孔形成制御を介した感受性誘導について述べてきたが、感染時に気孔を利用しない病原菌が感染した植物体や、新生葉以外の非感染葉においても感受性誘導は引き起こされる。これまでに、コムギ葉枯病菌 (*Zymoseptoria tritici*) が感染したコムギの非感染成熟葉、*P.*

syringae pv. *maclicola* や *Pst* DC3000 を接種したシロイヌナズナの非感染成熟葉で、それぞれの病原菌の二次感染に対して感受性が誘導されることが報告されている (Cui et al., 2005 ; Seybold et al., 2020)。また、角皮侵入するリンドウ炭疽病菌がリンドウの花蕾に一次感染すると、非感染成熟葉での二次感染が容易に成立することから、非感染成熟葉に SIS が誘導されることも見つかった (ドミンゲズら 令和 3 年度日本植物病理学会東北部会発表)。これらの SIS が、気孔侵入型の病原菌による気孔形成制御を介した SIS と同じメカニズムにより誘導されているのか今後の研究が待たれる。

一方で、サリチル酸を感染葉から新生葉に長距離輸送し、気孔密度を負に制御することで新生葉に抵抗性が誘導されることが近年報告されている (Dutton et al., 2019)。SAR は古くから多くの研究がなされ、その全貌が解明されつつあるが、新生葉の気孔密度制御を伴う SAR は、これまでに解明されてきた一般的な SAR とは一線を画した、独自のシステムを利用する新奇 SAR である可能性が示唆されている。このことをふまえると、気孔形成制御を介した SIS と、他の SIS では異なるメカニズムを持つ可能性も残されている。

おわりに

本稿では、病原体による植物の非感染葉への感受性誘導について、リンドウ葉枯病菌がリンドウの感染葉で行っている攻防の解明から、病原菌のエフェクターとそれに類似する植物由来の分泌ペプチドの関与を紹介した。新生葉の気孔数を増加させる現象と、分泌ペプチドの関与が、異なる種類の気孔侵入型の病原菌と様々な植物種に普遍的に存在しているメカニズムであったことは興味深い。さらに、AZI1 のような抵抗性誘導に関与する遺伝子の発現が SIS 誘導過程でも上昇していることに加えて、本稿では触れられなかったが、リンドウの非感染新生葉でも SIS 誘導過程で、抵抗性に関わる遺伝子の発現が見られている。これは、SIS 誘導過程において、抵抗性反応が一過的に誘導され、その後抵抗性が抑制された後に最終的な表現型として感受性を示しているのではないかと考えている。このことは、SAR 研究における試験条件を安定させる難しさを紐解く鍵にもなるのではないかと期待している。SIS と SAR が完全に独立した機構ではないということが見えてきた一方で、SIS を誘導する長距離シグナル因子は実際に存在しているのか、もし存在するのであれば分子の生成・受容機構など、今後の研究で明らかにしていきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究は、岩手生物工学研究センター在籍時に行った研究を主体としています。岩手県農業研究センター (病理昆虫チーム、花卉研究チーム)、岩手生物工学研究センター (園芸資源研究部およびゲノム育種研究部) との連携のもとで行われました。関係者の皆様に御礼申し上げます。また、研究の過程で Jean T. Greenberg 教授 (University of Chicago、アメリカ)、寺内良平教授 (京都大

学・岩手生物工学研究センター)、畠山勝徳教授(岩手大学)および西條雄介教授(奈良先端科学技術大学院大学)にご助言、ご支援をいただきました。これらの研究は、科研費(基盤C:18K05660)(基盤C:22K05651)ならびにJST さきがけの助成を受けて実施しました。また、東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点の支援を受けて実施しました。

引用文献

- Cui, J., Bahrami, AK., Pingle, EG., Hernandez-Guzman, G., Bender, C., Pierce, NE., and Ausubel, FM. (2005) *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:1791-1796.
- Durrant, W.E. and Dong, X. (2003) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*. 42:185-209.
- Dutton, C. Hōrak, H. Hepworth, C. Mitchell, A. Ton, J. Hunt, L. and Gray, JE. (2019) Bacterial infection systemically suppresses stomatal density. *Plant Cell Environ*. 42:2411-2421.
- Fu, Z.Q. and Dong, X. (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu Rev Plant Biol*. 64:839-863.
- Jung, HW., Tschaplinski, TJ., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, JT. (2019) Priming in systemic plant immunity. *Science* 324:89-91.
- Lake, JA., and Wade, RN. (2009) Plant-pathogen interactions and elevated CO₂: morphological changes in favour of pathogens. *J Exp Bot*. 60:3123-3131.
- Lim, GH., Shine, MB., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, AG., Lee, JY., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2016) Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host Microbe*. 19:541-549.
- Schwachtje, J., Fischer, A., Erban, A., and Kopka, J. (2018) Primed primary metabolism in systemic leaves: a functional systems analysis. *Sci Rep*. 8:216.
- Seybold, H., Demetrowitsch, TJ., Hassani, MA., Szymczak, S., Reim, E., Haueisen, J., Lübbers, L., Rühlemann, M., Franke, A., Schwarz, K., and Stukenbrock, EH. (2020) A fungal pathogen induces systemic susceptibility and systemic shifts in wheat metabolome and microbiome composition. *Nat Commun*. 11:1910.
- Tateda, C., Obara, K., Abe, Y., Sekine, R., Nekoduka, S., Hikage, T., Nishihara, M., Sekine, KT. and Fujisaki, K. (2019) The host stomatal density determines resistance to *Septoria gentianae* in Japanese gentian. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32:428-436.

R 遺伝子による陸上植物の抗ウイルス集団抵抗性

宮下 脩平*・Derib Alemu Abebe^{*,†}・狩野 凱*・Sietske van Bentum^{*,**}・
鈴木 万智*・西條 悠希*・高橋 英樹*

Miyashita, S., Abebe, D. A., Karino, G., van Bentum, S., Suzuki, M., Saijo, Y., and Takahashi, H.

Antiviral population resistance of land plants conferred by *R* genes.

Abstract

Land plant genomes carry tens to hundreds copies of NB-LRR-type *R* genes to combat various types of pathogens. A hypersensitive response, an HR, is the most characterized response among phenotypically different responses induced after recognition of virus infection by NB-LRR-type *R* genes, in which inhibition of systemic infection of the virus and induction of programmed-cell death (PCD) of the infected tissues are observed. PCD induction has been often considered as a mechanism to inhibit expansion of the virus-infected region within the infected plant; however, several studies have shown that PCD is not necessary for the inhibition. Moreover, our observation suggested that inefficient resistance induction resulted in PCD-mediated systemic death of the infected plant individual, thus leaving the merit of PCD induction an open question. We have recently proposed that PCD is induced in a post-hoc manner only in the cells that accumulated certain amount of virus and can function as an antiviral population resistance mechanism that inhibit plant-to-plant virus infections by eliminating the source of infection, even when systemic death is induced. Our simulation showed that such a population resistance can be functional only when the host organisms propagate locally, implying that the population resistance mechanism can be specific to land plants. We discuss the evolution an *R* gene and the *R* gene family based on the findings.

Key words: *R* genes, systemic HR, micro-HR, programmed-cell death

* 東北大学大学院農学研究科 Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, JAPAN (*Corresponding author: shuhei.miyashita.d7@tohoku.ac.jp)

** Department of Biology, Utrecht University, Utrecht, the NETHERLANDS

† Present Address: Department of Plant Science, College of Agriculture and Natural Resource Sciences, Debre Berhan University, Debre Berhan, ETHIOPIA

1. NB-LRR 型 *R* 遺伝子が誘導する細胞死の存在意義に対する疑問

R 遺伝子 (*Resistance gene, R gene*) は植物がもつ優性の病害抵抗性遺伝子の総称であるが、その大半は NB (nucleotide-binding) ドメインと LRR (leucine-rich repeat) ドメインをもつレセプタータンパク質をコードする NB-LRR 型 *R* 遺伝子である (図 1a)。陸上植物は数十～数百コピーの NB-LRR 型 *R* 遺伝子をもち、これらが様々な病原体に対する抵抗性を付与している。NB-LRR 型 *R* 遺伝子の遺伝子産物である *R* タンパク質は、N 末端側に TIR (Toll-interleukin receptor) または CC (coiled-coil) ドメインのいずれかをもち、続いて NB ドメイン、LRR ドメインを C 末端側にもつ。多くの場合、*R* タンパク質が病原体由来の特定のタンパク質を特異的に認識し、直接的あるいは helper NLR (helper NB-LRR receptor) タンパク質を介して間接的に抵抗性を誘導する (Collier and Moffett, 2009; Essuman et al., 2022)。主に LRR ドメインの配列多様性が認識対象の多様性に寄与しているとされるが、実際に認識対象となる病原体やそのタンパク質が明らかになっている *R* 遺伝子はほんの一握りである。また藻類を含む植物ゲノムの比較解析からは、陸上植物において NB-LRR 型 *R* 遺伝子のコピー数が急激に増大したことが分かっている (Gao et al., 2018)。

R タンパク質がウイルス感染を検知して誘導する応答としてよく知られているのは、過敏反応 (HR, hypersensitive response) である。HR では接種葉でのプログラム細胞死による局部壊死病斑の形成と、接種葉以外へのウイルスの全身感染の阻害が起こる。HR で誘導される細胞死はウイルスの全身感染の阻害に寄与するとされることが多いが、それに疑問を投げかける知見もある。例えばシロイヌナズナの NB-LRR 型 *R* 遺伝子である *RCY1* はキュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) の外被タンパク質の蓄積を認識して HR を誘導するが (Takahashi et al., 2001; Takahashi et al., 2002) (図 1b)、*RCY1* を 10 コ

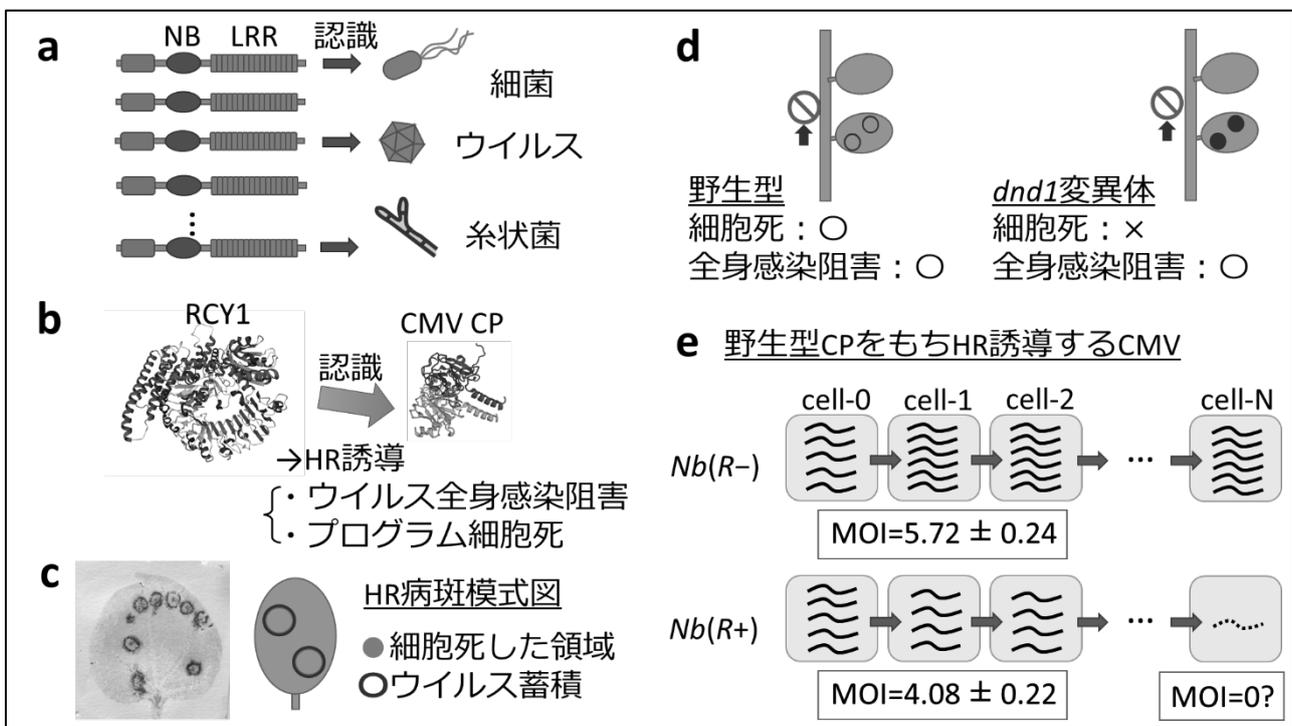


図 1 NB-LRR 型 *R* 遺伝子の概略・*RCY1* が野生型 CMV 感染時に誘導する HR

ピーもち過剰発現する形質転換体シロイヌナズナでは HR 誘導時と同様に全身感染は阻害されるが、細胞死は起こらず一細胞レベルでウイルス蓄積が抑制される高度抵抗性 (ER, extreme resistance) が誘導される (Sekine et al., 2008; Ishihara et al., 2015)。このことは細胞死が全身感染の阻害に必須ではないことを示唆する。また HR 誘導時に細胞死が起きた領域の外側にウイルスタンパク質の蓄積がリング状に見られることが複数のウイルスで知られており、感染域の最末端では感染源となりうるウイルス粒子は残っていても細胞間移行が止まっていること (Wright et al., 2000; Lukan et al., 2018) (図 1c)、RCYI をもつシロイヌナズナ *dnd1* 変異体では細胞死誘導なしに CMV 全身感染の阻害が起きることなどからも (Takahashi et al., 2012a) (図 1d)、細胞死がウイルスの全身感染の阻害に寄与するとは考えにくく、したがって細胞死の生存戦略上の存在意義は明らかとは言えなかった。

一細胞に感染するウイルスゲノム数の平均値を MOI (multiplicity of infection) という。これまでに筆者らは、ムギ類萎縮ウイルスやトマトモザイクウイルスが細胞間移行して新しい細胞に感染する際の MOI は 5 程度であることを独自の実験系を用いて示してきた (Miyashita and Kishino, 2010; Miyashita et al., 2015)。そこで CMV をシロイヌナズナでの応答を再現する RCYI 由来 R 遺伝子形質転換体 *Nicotiana benthamiana* [以下 *Nb(R+)*] (Takahashi et al., 2012b) と R 遺伝子をもたない野生型の *N. benthamiana* [以下 *Nb(R-)*] に接種し、最初の感染細胞から 1 回目と 2 回目の細胞間移行における MOI を推定したところ、*Nb(R-)* で 5.72 ± 0.24 に対して *Nb(R+)* では 4.08 ± 0.22 と、R 遺伝子の存在によって MOI が 28.7% 低下していることが分かった (Abebe et al., 2021)。この MOI の低下は接種後 20 時間以内、つまり細胞死が誘導されるよりも早い段階で観察されることから、やはり HR におけるウイルス感染性の低下に細胞死は必須ではないことが支持された。技術的な限界により 3 回目以降の細胞間移行における MOI を推定することはできないが、HR 誘導時には MOI は徐々に低下し、最終的には 0 となって接種葉における感染域の拡大が停止するものと考えられた (図 1e)。

2. 全身 HR を誘導するウイルス変異体の出現、さらに深まった疑問

HR 誘導時の CMV の MOI 低下について検討していたところ、接種した *Nb(R+)* 個体のうちにウイルスが上位葉に感染して壊死を起こしているものが見つかった (図 2a)。上位葉から RNA を抽出して感染しているウイルスの配列を調べると、CP に 1 アミノ酸置換 (T45M) をもたらす 1 塩基置換 (ACG→AUG) があった (図 2b)。そこでこの変異をもつ CMV を作出して *Nb(R+)* に接種すると、植物体の全身壊死が再現的に見られた (図 2c)。またこの CP-T45M 変異体は *Nb(R-)* には野生型同様に細胞死を起こさず全身感染すること、RCYI による認識を逃れる N31T 変異との二重変異体が細胞死を起こさず全身感染することから、観察された全身壊死は R 遺伝子依存的に起こる全身 HR (systemic HR, SHR) であることが分かった。

ウイルス感染による SHR 誘導は実験室だけでなく R 遺伝子をもつ作物を導入した圃場でも報告がある。また R 遺伝子の関与が明確でない全身壊死の報告のうち少なくとも一部は SHR が原因であると考えられ、SHR は農業上重大な被害をもたらしていると推測される。しかし SHR が、抵抗性誘導が強すぎて細胞死が暴走して起こる現象なのか、抵抗性

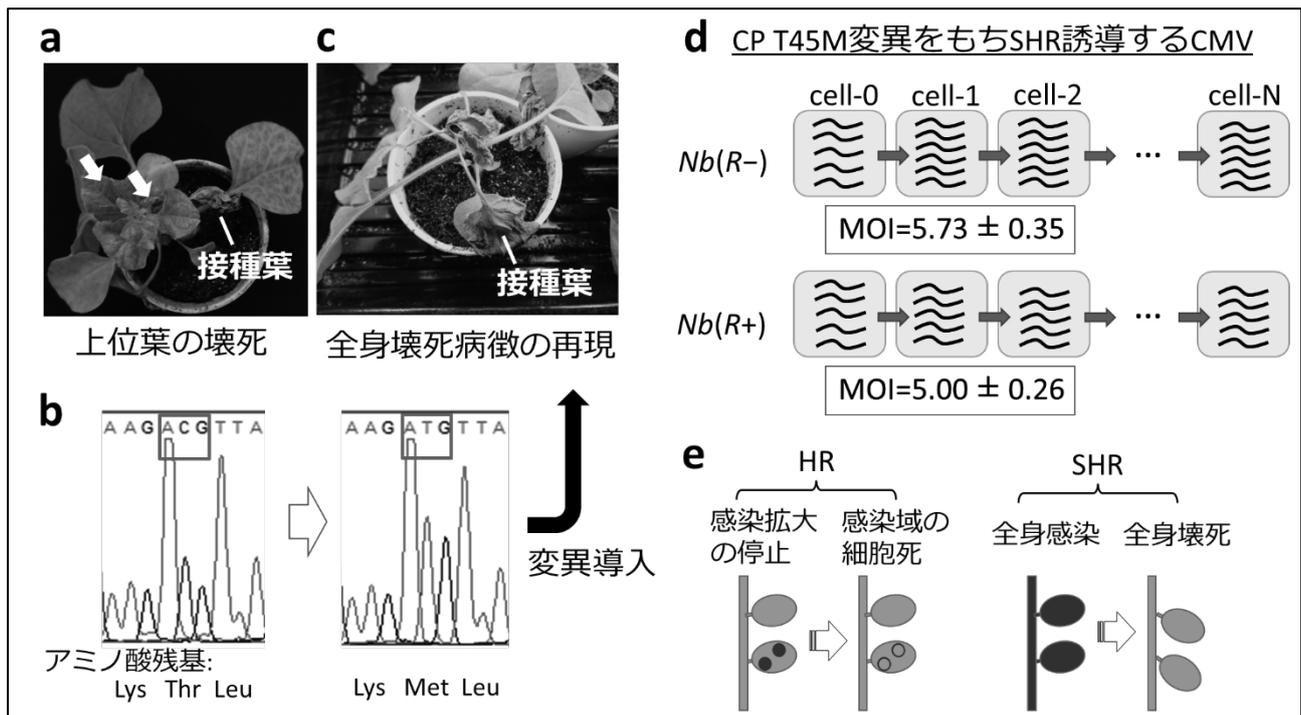


図2 SHR を誘導する CMV 変異体とその誘導メカニズム

誘導が不十分でウイルス感染拡大を抑えきれずに起こる現象なのか、明らかではなかった。そこで CP-T45M 変異体を *Nb(R-)* と *Nb(R+)* に接種して 1 回目と 2 回目の細胞間移行における MOI を推定したところ、*Nb(R-)* では 5.73 ± 0.35 、*Nb(R+)* では 5.00 ± 0.26 であり、*R* 遺伝子の存在による SHR 誘導時の MOI 低下は 12.7% であった (図 2d)。これは HR 誘導時に見られた MOI 低下(28.7%)よりも小さかったことから、SHR は抵抗性誘導が不十分な場合にウイルスの感染拡大を抑えきれず、ウイルスの全身感染後に細胞死が起きて全身が壊死する現象であると結論付けられた (図 2e)。それと同時に、今回得られた CP-T45M 変異体は、*RCY1* 由来 *R* 遺伝子による認識を部分的に逃れるものと考えられた (Abebe et al., 2021)。

ここで 2 つの疑問が明確になった。1 つは NB-LRR 型 *R* 遺伝子をもつリスクについてである。ウイルスは一般に変異率が高い。そのため我々が実験室内で観察したような *R* 遺伝子による認識を部分的に逃れる変異は自然界でも容易に生じており、その結果 SHR が誘導されることはごく頻繁に起こる現象であると想像される。その場合、*R* 遺伝子を持つこと自体が植物個体にとっての大きなリスクとなるのではないかと。また新しくウイルス抵抗性 NB-LRR 型 *R* 遺伝子を獲得する状況を考えて場合 (言い方を変えれば、NB-LRR 型 *R* 遺伝子が突然変異により新たにあるウイルスタンパク質を認識できるようになった場合)、おそらくその認識強度は当初不十分で SHR を誘導してしまうのではないかと。その場合、植物は花も実もつけずに死んでしまうので、新しい NB-LRR 型 *R* 遺伝子は出現後すぐ淘汰されてしまうのではないかと。もう 1 つの疑問は、先述の疑問がより深まったもの——すなわち、細胞死はウイルス全身感染の障害に必須ではないのに、上述のようなリスクを抱えてまで何故わざわざ「事後的に」細胞死を起こす必要があるのか——である。これらの想定される不都合にもかかわらず、実際の陸上植物はウイルス抵抗性 NB-LRR 型 *R* 遺伝子を有し、現に細胞死を誘導している。何か面白いことを見落としている、と筆者らは考えた。

3. 自殺型集団抵抗性の提案・繁殖の局地性の必要性

そこで筆者らが思い至ったのが、NB-LRR 型 *R* 遺伝子が誘導する細胞死が個体レベルではなく集団レベルの抵抗性として機能する可能性である (図 3a)。植物ウイルスはアブラムシ等の微小昆虫や土壤中の線虫、変形菌といった媒介生物により植物体間を水平伝搬されるものが大半である。これらの媒介生物は移動距離が小さく、例えばアブラムシでは一回の飛翔での移動距離は平均 5 m に満たないことが報告されている (Nemecek et al., 1993)。このような状況では HR、SHR のいずれが誘導される場合でも、ウイルス感染細胞の細胞死で感染植物体中のウイルスが消滅することが周囲の植物体への感染源をなくすことにつながる、というアイデアである。ただし一般に、自己犠牲を伴う形質はその原因遺伝子が自己犠牲と同時に淘汰されるため選択され得ないとされる。しかし筆者らは、陸上植物のように比較的局地的に繁殖する生物では遺伝的に近縁な個体が群生するため、ある個体の自己犠牲は周囲の「兄弟姉妹」を守ることにつながり、原因遺伝子の選択をもたらさうと考えた。この自殺型集団抵抗性の考えに従えば、SHR 誘導する *R* 遺伝子であってもそれをもたないよりは適応的になる (つまり選択される) 可能性があり、「事後的な細胞死」に合目的な意義をもたせることもできる。この考えは本当に成立しうのだろうか。

そこで以下のような数理モデルを作成してシミュレーションを行った。植物はウイルス抵抗性 NB-LRR 型 *R* 遺伝子を獲得したばかりで SHR を誘導するものと、*R* 遺伝子を獲得しておらず感受性のもの (それぞれ SHR(+)*R*植物と SHR(-)*R*植物とする) を想定する (図 3b)。これらの植物は繁殖力再生産率とウイルス非感染時の死亡率 (0.1) に差はないが、ウイルス感染時の死亡率は SHR(+)*R*植物で 1 (つまり即死) に対し SHR(-)*R*植物では 0.2 (非感染時の半分の寿命) で異なるものとした。個体レベルの挙動のみを示したこの表だけを見ると SHR(+)*R*植物は SHR(-)*R*植物に比べて圧倒的に不利に見える。ここに繁殖の局地性を導入していく。まず 100×100 マスの空間を想定し、1 マスにつき植物個体 1 個体が生育する

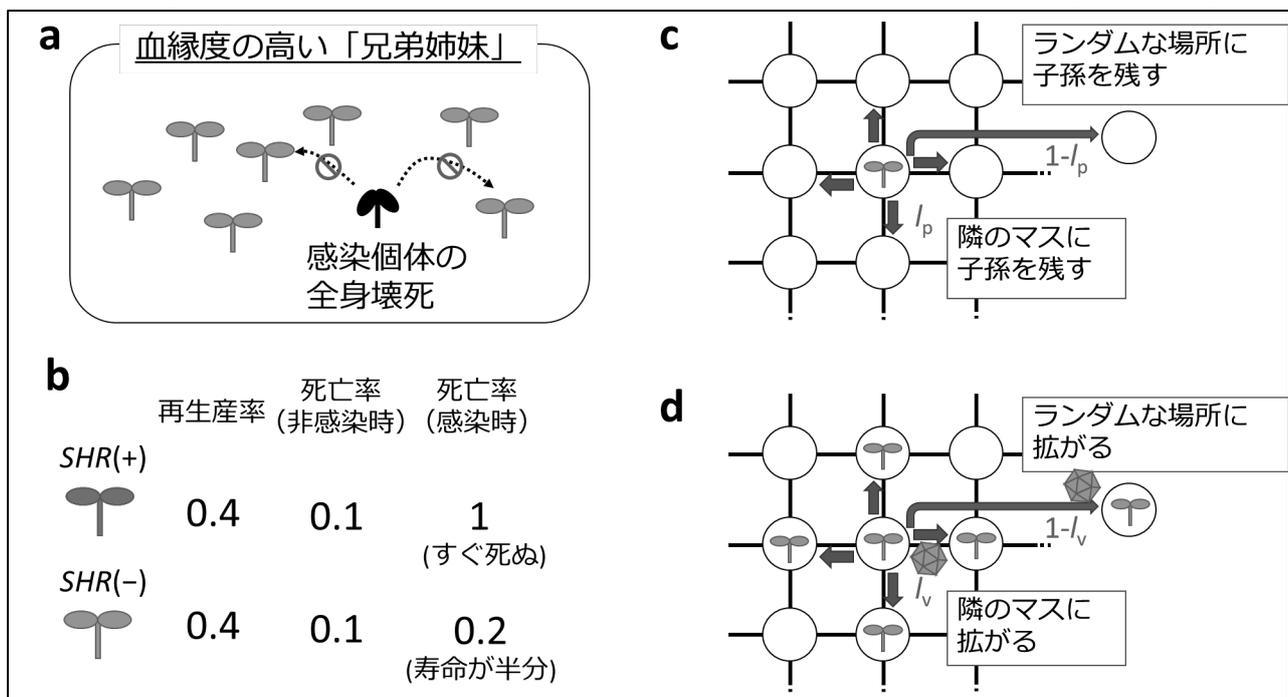


図 3 細胞死による抗ウイルス集団抵抗性のアイデアとその数理モデル化

ものとする。植物は確率 I_p で隣接マスに子孫を残し、残りの確率 $1-I_p$ で隣接マスにこだわらず空間中のランダムなマスに子孫を残すものとする (図 3c)。まずウイルス非存在下で I_p の値を 1.00, 0.95, 0.90 と変化させてシミュレーションした (図 4a)。SHR(+)植物と SHR(-)植物がパッチ状に生息する様子が見られるが、 I_p が大きいほどパッチのサイズも大きくなっており、これが I_p の違いが植物の生きざまにもたらす効果であると分かる。ここにウイルスを導入する。ウイルスは低頻度でこの空間中に流入しつづけるものとし、感染植物からの水平伝搬では比較的高い確率 ($I_v=0.90$) で隣接マスの植物に運ばれるものとした (図 3d)。このような条件で、 I_p の値を変えてシミュレーションしたところ、 $I_p=1.00$ の場合は時間経過に伴って SHR(+)植物が増加して優占したのに対し、 $I_p=0.95$ や 0.90 では逆に SHR(-)植物が増加して優占した (図 4b)。このことから繁殖が局地的に起こる場合に限り、SHR 誘導が進化的に有利になりうることを示された。このことは自殺型集団抵抗性が陸上植物特有の生存戦略として成立した可能性を示唆しており、NB-LRR 型 R 遺伝子のコピー数が陸上植物で急激に増大した理由の少なくとも一部を説明するものと考えられた (Abebe et al., 2021)。

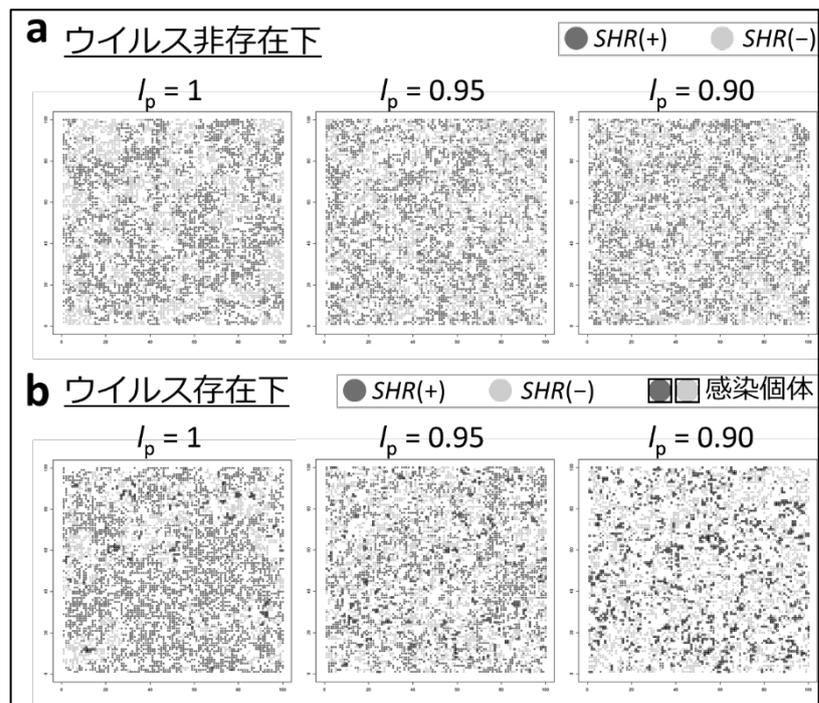


図 4 繁殖の局地性のパラメタ値(I_p)を変えて行ったシミュレーションの結果

4. 強い抵抗性を誘導する CMV 変異体シリーズ

筆者らは半ば偶然に、CP のアルギニンリッチモチーフ (aa 13-19: RRRRLRR) を欠失した CMV を *Nb(R+)* に接種した場合に、ウイルスの蓄積が検出限界以下に抑制され、壊死病斑も形成されない ER が誘導されることを見出した (Karino et al., 2023) (図 5a)。このモチーフは CMV 粒子の内側にくるウイルス RNA 結合領域と考えられ、ウイルス粒子形成に必須とされる (Smith et al., 2000; Schmitz and Rao, 1998)。このモチーフのアルギニン残基のうち 6 つ全て、あるいは 4 つまたは 2 つをアラニン残基に置換した CMV 変異体は *Nb(R+)* の接種葉にほとんど壊死病斑を形成しないもののごく少数の微小な壊死病斑を形成した。このような微小な壊死病斑の形成とウイルスの全身感染阻害が見られる応答は HR の中でも特に micro-HR と呼ばれる。つまりこれらの変異体はほとんどのサイトで ER を誘導した一方、ごくまれに micro-HR を誘導したものと考えられた。さらにこれらの変異体に *RCY1* 由来 R 遺伝子による認識を部分的に逃れる T45M 変異を導入した二重変異体を作製したところ、2 つのアラニン置換と T45M をもつ二重変異体(RRM2A;T45M)は *Nb(R+)* の接種葉に

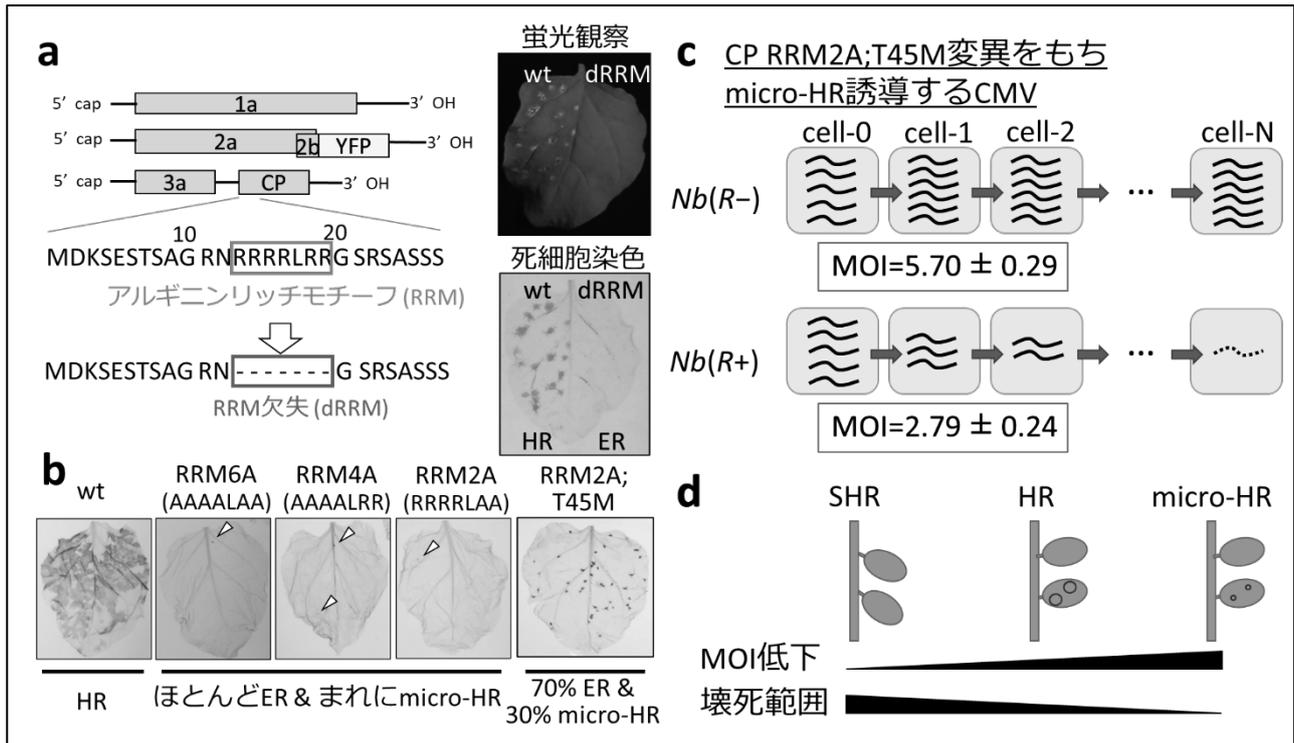


図5 強い抵抗性を誘導する CMV 変異体の発見・MOI 低下と壊死範囲の逆相関

数十の微小な壊死病斑を形成した。形成された病斑数はこの二重変異体が *Nb(R-)* に形成する感染域数のおよそ 30%であったことから、この変異体は *Nb(R+)* では約 30%のサイトで micro-HR を誘導し、残りの約 70%のサイトでは ER を誘導したものと推察された (図 5b)。

HR を誘導する *R* 遺伝子を高発現した場合に micro-HR が誘導される例などから (Cooley et al., 2000)、micro-HR では HR よりも強い抵抗性が誘導されていることがこれまで間接的に示唆されてきたが、そのことを直接的に示すデータはなかった。そこで上述の micro-HR をある程度の頻度で誘導する二重変異体 RRM2A;T45M について、1 回目と 2 回目の細胞間移行における MOI を測定したところ、*Nb(R-)* では 5.70 ± 0.29 、*Nb(R+)* では 2.79 ± 0.24 で、*R* 遺伝子の存在による MOI 低下は 51.5%であり、HR 誘導時の MOI 低下 (28.7%) よりも顕著であった。このことから micro-HR では HR より強い抵抗性が誘導されていることが定量的に示された (Karino et al., 2023) (図 5c)。

SHR、HR、micro-HR 誘導時の 1 回目と 2 回目の細胞間移行における MOI の低下はそれぞれ 12.7%、28.7%、51.5%であり、壊死範囲の大きさと逆相関の関係にある (図 5d)。これは MOI 低下率が大きいほどウイルスの感染拡大が早く終結し (つまり MOI=0 になり)、ウイルスがある程度以上蓄積した細胞でのみ「事後的な細胞死」が起きると考えれば合理的に理解できる。この理解は ER にも敷衍可能で、強い抵抗性によりウイルスが最初の感染細胞であまり蓄積しなかった場合に細胞死が誘導されない現象として ER を説明することができる。また重要なことに、周囲の血縁個体にウイルスを拡散しない集団抵抗性については SHR、HR、micro-HR、ER 誘導ともに同等の効果があり、植物の生存戦略にとっては本質的な違いはないものと考えられた。

5. R遺伝子およびR遺伝子群の進化過程、個体レベル/集団レベルの抵抗性

図6abは任意のウイルス抵抗性R遺伝子の進化過程と適応度を模式的に表現したものである。もともとあるウイルスに感受性であった植物集団内に遺伝子重複およびランダムな変異によりそのウイルスを認識するR遺伝子が偶然生じたとする。そのR遺伝子が誘導する抵抗性は当初不十分で、SHRを誘導するケースが多いと考えられる。個体レベルの適応度のみ注目した場合、SHRの誘導は感受性のままよりも不利であるが、集団レベルの適応度は自殺型集団抵抗性の効果により感受性のままよりも高く、個体レベルと集団レベルの適応度を合わせるとSHR誘導が感受性を上回る。これにより、新しいウイルス抵抗性R遺伝子は淘汰されずに集団内でその割合を増やしていくことができる。HRやERの誘導時もSHR誘導時と同様に周囲の個体へのウイルスの感染拡大が阻害されるため集団レベルの適応度は同程度に高いが、個体レベルの適応度は個体が死んでしまうSHR誘導よりもHR誘導やER誘導で高い。そのためSHR誘導するR遺伝子にRタンパク質-ウイルスタンパク質間の相互作用を強くするような変異が生じた場合やmRNA転写量を向上させる変異が生じた場合などにそれらが選択されてHR誘導への進化が起きる。ERやmicro-HRはHRよりもウイルス変異により打破されにくいという点で個体レベルの適応度が高いと考えられるため(Abebe et al, 2021)、HR誘導からmicro-HR誘導、ER誘導への進化も同様に適応により起こりうる。前項で複数のアラニン置換変異体がmicro-HRとERの両方を誘導したことから、micro-HRとERの間には誘導される抵抗性の強度に大きな隔りがあるわけではないものと考えられる。そのためR遺伝子のHR誘導からER誘導への進化は特別に「幸運な」変異が必要なわけではなく、突然変異の継続的な蓄積によって起こりうるものと考えられた。ウイルスの変異により再び完全、あるいは部分的に抵抗性が打破されて低レベルの抵抗性応答に戻る可能性があるが、その確率はウイルスの複製サイクル数に

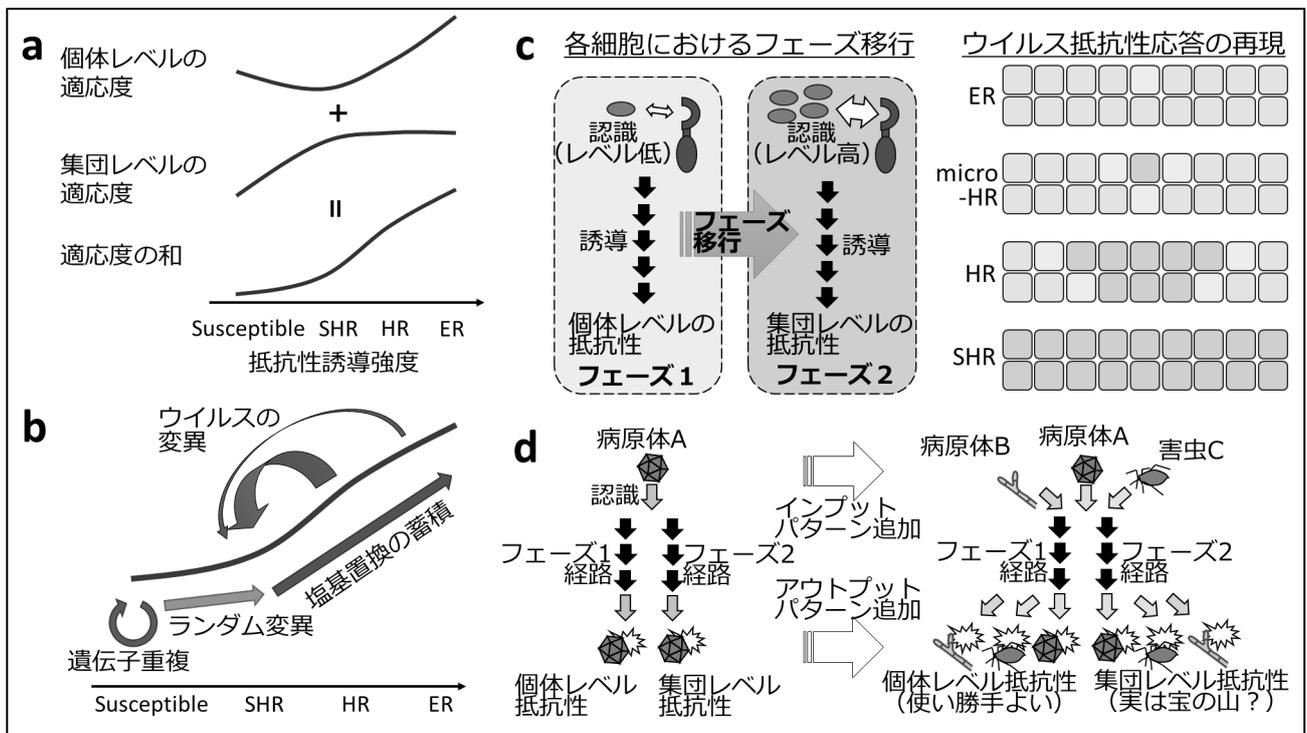


図6 R遺伝子およびR遺伝子群の進化・フェーズ移行の提案

依存し、感染細胞数が少ないほど低い (SHR > HR > micro-HR > ER)。そのため ER 誘導できるまで *R* 遺伝子の適応が進んでしまえば、集団外部からウイルス（しかもその ER を打破する変異を偶然もつもの）がやってこない限り安泰といえる。そう考えると、自然界の植物がもつ NB-LRR 型 *R* 遺伝子にはウイルスに対して ER を誘導するものが実は多数存在する可能性があり、それらを我々は非宿主抵抗性と区別できていないのかも知れない。

「事後的な細胞死」の考え方ではウイルス感染細胞のふるまいに2つのフェーズを想定する (図 6c)。すなわち、*R* 遺伝子をもつ植物の細胞にウイルスが感染した場合、まずウイルス蓄積を抑制してその植物個体内での感染拡大を防ごうとする段階 (フェーズ1) があり、抑制に失敗した場合に細胞死によって集団内への感染拡大を防ごうとする段階 (フェーズ2) に移行する、という想定である。この単純な原則を適用するだけで、ER, micro-HR, HR, SHR という見かけの異なるウイルス抵抗性応答を再現できる。また NB-LRR 型 *R* 遺伝子群のこれまでの進化を想像した場合、最初にある病原体の認識からシグナル伝達、その病原体に対する抵抗性発現までの経路が完成したあと、認識対象 (インプット) と抵抗性発現 (アウトプット) のパターンが追加されていったものと想像される。そのためこのフェーズ移行の構造は、ウイルスだけでなく糸状菌や細菌、昆虫などに対する NB-LRR 型 *R* 遺伝子を介した抵抗性にも共通している可能性がある (図 6d)。農業現場での利用を考えた場合、フェーズ1で誘導される個体レベルの抵抗性には使い勝手がいいものも多く含まれることが期待される。フェーズ2で誘導される集団レベルの抵抗性には細胞死誘導以外にも自己犠牲的で注意を要するものが含まれる一方で、実は我々が気づきにくい有用なものも多数含まれる宝の山かも知れない。

おわりに

「自らの命を犠牲にして周囲の個体を守る」というと植物には人間顔負けの尊い精神があるかのように聞こえるかもしれないが当然そのようなことはなく、「自己」の範囲が (人間が定義する) 一個体とは限らない、というだけのことだと理解している。その観点では我々ヒトの「自己」も子孫やきょうだい、血縁度の高いムラに拡張されうること気づくと同時に、そこに愛が生じる必然も見出すことができる。先入観にとらわれずに自然選択の単位を想像しながら生物を見るとより多くの気づきがあるかもしれない。

謝辞

CMV 感染性 cDNA クローンを提供いただきました増田税博士、鈴木匡博士、竹下稔博士に御礼申し上げます。この研究は主に日本学術振興会科研費 (16H06185, 17K19257, 19H02953, 19K22300, 21K05591, 22KK0081) の助成を受けて実施しました。また Derib Alemu Abebe は文部科学省国費外国人留学生制度、Sietske van Bentum は東北大学自然科学系短期共同研究留学生交流プログラム (COLABS) の支援を受けて研究を実施しました。

引用文献

Abebe DA, van Bentum S, Suzuki M, Ando S, Takahashi H, Miyashita S (2021) Plant death caused by inefficient induction of antiviral R-gene-mediated resistance may function as a suicidal population resistance mechanism.

Commun Biol, 4:947 <https://doi.org/10.1038/S42003-021-02482-7>

- Collier SM, Moffett P (2009). NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci* 14:521–529 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.001>
- Cooley MB, Pathirana S, Wu HJ, Kachroo P, Klessig DF (2000). Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* 12:663–676 <https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.663>
- Essuman K, Milbrandt J, Dangl JL, Nishimura MT (2022) Shared TIR enzymatic functions regulate cell death and immunity across the tree of life. *Science* 377:eabo0001 <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABO0001>
- Gao Y, Wang W, Zhang T, Gong Z, Zhao H, Han G (2018). Out of water: the origin and early diversification of plant R-genes. *Plant Physiology*, 177(1), 82-89. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00185>
- Karino G, Abebe DA, Saijo Y, Takahashi H, Miyashita S (2023) Artificial coat protein variants of cucumber mosaic virus induce enhanced resistance upon recognition by an R gene. *J Gen Plant Pathol* (in press) <https://doi.org/10.1007/s10327-023-01133-5>
- Miyashita S, Kishino H (2010) Estimation of the size of genetic bottlenecks in cell-to-cell movement of soil-borne wheat mosaic virus and the possible role of the bottlenecks in speeding up selection of variations in trans-acting genes or elements. *J Virol* 84:1828-1837 <https://doi.org/10.1128/JVI.01890-09>
- Miyashita S, Ishibashi K, Kishino H, Ishikawa M (2015) Viruses roll the dice: the stochastic behavior of viral genome molecules accelerates viral adaptation at the cell and tissue levels *PLoS Biol* 13: e1002094 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002094>
- Nemecek, T., Fischlin, A., Derron, J., & Roth, O. (1993). Distance and direction of trivial flights of aphids in a potato field. *SYSTEMS ECOLOGY ETHZ*.
- Schmitz I, Rao AL (1998) Deletions in the conserved amino-terminal basic arm of cucumber mosaic virus coat protein disrupt virion assembly but do not abolish infectivity and cell-to-cell movement. *Virology* 248:323–331 <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9257>
- Sekine KT, Kawakami S, Hase S, Kubota M, Ichinose Y, Shah J, Kang HG, Klessig DF, Takahashi H (2008) High level expression of a virus resistance gene, RCY1, confers extreme resistance to cucumber mosaic virus in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1398–1407 <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-11-1398>
- Takahashi H, Suzuki M, Natsuaki K, Shigyo T, Hino K, Teraoka T, Hosokawa D, Ehara Y (2001) Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 42:340–347 <https://doi.org/10.1093/pcp/pce039>
- Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Sukanto, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y, Dinesh-Kumar SP (2002) RCY1, an Arabidopsis thaliana RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J* 32:655–667 <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01453.x>
- Takahashi H, Kai A, Yamashita M, Ando S, Sekine KT, Kanayama Y, Tomita H (2012a) Cyclic nucleotide-gated ion channel-mediated cell death may not be critical for R gene-conferred resistance to cucumber mosaic virus in Arabidopsis thaliana. *Physiol Mol Plant Pathol* 79:40-48 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.03.003>
- Takahashi H, Shoji H, Ando S, Kanayama Y, Kusano T, Takeshita M, Suzuki M, Masuta C (2012b) RCY1-mediated resistance to cucumber mosaic virus is regulated by LRR domain-mediated interaction with CMV(Y) following degradation of RCY1. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1171–1185 <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0076-R>

イネのNLRタンパク質によるブロムモザイクウイルス抵抗性

三瀬 和之*・鈴木 慎司*・張 一凡*・大竹 竜馬*・嶋本 果穂*・大矢 卓明*・
鷺津 充彦*・新田 浩二*・高田 昌汰*・清水 元樹**・寺石 政義*・奥本 裕***・
海道 真典***・安達 広明*・峯 彰*・寺内 良平**・高野 義孝*

Mise, K., Suzuki, S., Zhang, Y., Ohtake, R., Shimamoto, K., Oya, T., Washizu, M., Nitta, K.,
Takata, S., Shimizu, M., Teraishi, M., Okumoto, Y., Kaido, M., Adachi, H., Mine, A.,
Terauchi, R., and Takano, Y.

Rice NLR-mediated resistance to brome mosaic virus.

Abstract

Brome mosaic virus (BMV) is a model plant RNA virus with which comprehensive analyses on both viral and host factors in viral RNA replication has been performed at single cell levels and *in vitro*. In contrast, analyses of BMV infection in plants including those of resistance mechanisms have been mainly focused on viral factors. Since the discovery of a rice-infecting strain of BMV, we have studied resistance mechanisms in BMV-rice interactions. So far, we have isolated two nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR)-type resistance genes, named *Resistance to brome mosaic virus 1 and 2 (RBM1 and RBM2)*, which confer resistance to BMV in rice (*Oryza sativa*). In monocots, only a few NLR genes conferring anti-viral resistance were isolated very recently. Interestingly, both RBM1 and RBM2 proteins likely recognize the movement protein 3a of BMV as an avirulence factor in a different manner. Detailed analysis of such recognition mechanisms should help us utilize these rice-derived NLR genes in other important monocot crops such as wheat.

Key words: *Oryza sativa*, nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) protein, brome mosaic virus (BMV), effector-triggered immunity (ETI), avirulence factor (Avr), viral resistance

* 国立大学法人京都大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Kyoto University

** 公益財団法人岩手生物工学研究センター Iwate Bioresource Research Center

*** 現 摂南大学農学部 Faculty of Agriculture, Setsunan University

1. はじめに

植物は細菌や菌類等の病原微生物の攻撃に対してPTI (pattern-triggered immunity)とETI (effector-triggered immunity)という2層の免疫機構をもつ。PTIでは病原体に共通の分子パターンを細胞膜で受容し抵抗反応を誘導する。病原体は自身のエフェクターによってPTIを抑制し、感染を成立させる。さらに抵抗性植物ではエフェクターを認識し、しばしば過敏感細胞死を伴う強い抵抗性反応 (ETI) で対抗しており、認識されるエフェクターは非病原力因子 (avirulence factor, Avr) と呼ばれる。ETIでの認識には細胞内受容体として、nucleotide-binding (NB)ドメインとleucine-rich repeat (LRR)ドメインを持つタンパク質(NLRタンパク質)が知られている (図1)。

殆どのNLRタンパク質はさらにN末端にcoiled-coil (CC)等の特徴的なドメインをもつ。NLRタンパク質は大多数の抵抗性遺伝子(R遺伝子)にコードされていることから、植物免疫機構でのNLRの機能解明は長年の中心的な課題だが謎であった。最初のNLR型抵抗性遺伝子の単離から四半世紀を経て、2019年に3次・4次構造が解明されたことにより、NLRタンパク質の研究は大きな転換点を迎えた (Wang *et al.*, 2019a; 2019b)。

ウイルス感染に対して植物が示す第一層の抵抗性として、細胞内に侵入したウイルスが複製する際に生じる複製中間体のRNAを認識し分解する機構(RNAi)が知られているが、対してウイルスの多くは自身の種々のタンパク質でRNAiを回避し、複製と感染拡大を行う。植物はウイルス増殖に必須な遺伝子の劣性変異で対抗したり、ウイルスのAvrタンパク質をNLRタンパク質で認識し、細菌や菌類に対するのと同様にETIを発動する。既知の多くのNLRタンパク質の中でウイルス抵抗性にはごく一部のみが関与している。

ブロモウイルスのbrome mosaic virus (BMV)ではRNA複製に関する多くの先駆的研究がある。ゲノムは3分節のプラス鎖RNAで、RNA 1と2にはRNA複製酵素成分である1a, 2aタンパク質が、RNA3には植物細胞間の移行に重要な3a移行タンパク質(MP)と粒子成分の外被タンパク質(CP)がコードされている (図1)。BMVのRNA複製に関する研究はAhlquist博士のグループ (Noueiry and Ahlquist, 2003) やKao博士のグループ (Kao and Sivakumaran, 2000) によって細胞レベルあるいは*in vitro*で精力的に進められてきた。一方、Rao博士のグループ (Rao and Grantham, 2005) や我々はオオムギ、ササゲ、キノアといった作物を用いて植物への感染に関わるウイルス因子を解析してきた (Fujita *et al.*, 2000; Okinaka *et al.*, 2003)。しかしそれらの研究で、様々な特異的抵抗性に関わるウイルス因子に関する多くの知見が得られたものの、植物側の因子についてはシロイヌナズナ等のモデル植物が使えないこともあり、研究の進展が遅れた。我々は、BMVに近縁なSBLV, CYBV, MYFVがシロイヌナズナに感染することを報告してきた (Fujisaki *et al.*, 2003; Iwahashi *et al.*, 2005; Narabayashi *et al.*, 2009)。しかしながら、BMVについては野生タバコの *Nicotiana benthamiana*に感染することを利用した若干の研究に留まり (Kaido *et al.*, 2007)、BMVはその自然宿主であるイネ科のオオムギやコムギには感染するものの、イネ (*Oryza sativa*)

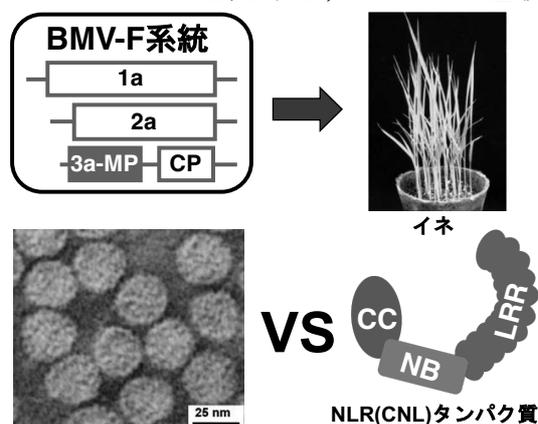


図1. BMV F系統は4個の遺伝子をコードするRNAウイルスでイネはCCタイプのNLRタンパク質(CNL)で対抗している。

への感染の報告は無かった。2006年にDingとNelsonのグループがイネに感染するBMV系統を発見し、BMV-イネの系を用いることが可能となった (Ding *et al.*, 2006)。イネは、重要作物であるだけでなく、ゲノム情報も豊富で、遺伝子組換えも容易に行え、周辺の様々な実験リソースも豊富にあることから、その後、研究の進展が加速した。

2. イネに対する種々の BMV 系統の感染性とウイルス因子の解析

Ding らが発見したイネに感染する BMV の系統はイネ科ウシノケグサ属牧草の Tall Fescue から分離され、Fescue 系統 (F 系統) と命名された (Ding *et al.*, 2006)。この系統がインディカイネ品種の IR8 に感染するという知見を元に我々が実験室で保存していた他の様々な BMV 系統を IR64 やハバタキというインディカイネに接種して感染性を調査した。その結果、F 系統が最も高いウイルス蓄積を示す一方で、他にも若干蓄積が見られる系統や殆ど蓄積の見られない系統まで様々であった。我々は、この中で品種ハバタキに対して全身感染しない KU5 系統と良好な蓄積を示した F 系統を比較しそのような感染性の違いに関わるウイルス因子を解析した。これら 2 系統のウイルスはゲノム全体の塩基レベルで 99.4%の相同性を示し、極めて類似している。両ウイルス間で RNA ゲノムや遺伝子断片の組換えウイルスを作成し調査した結果、興味深いことにウイルスの複製酵素成分タンパク質 2a をコードする遺伝子の 3'末端の 2 塩基の非同義置換変異が全身感染の決定因子であることが判明した。この 2 アミノ酸の置換は RdRP のポリメラーゼ保存領域の C 端側にある非保存領域における違いであった。更にこれら 2 塩基のみが異なるウイルスを用いてイネにおける感染性を調査した結果、プロトプラストでのウイルス蓄積は同レベルで、接種葉におけるウイルスの広がりも同程度であった。維管束系を利用した長距離全身移行過程のどこかで 2 アミノ酸の違いが全身感染性を決めていることが示唆された。

3. 種々のイネ品種の BMV に対する感受性

IR64 に最も効率良く感染した F 系統を用いて、コシヒカリ等のジャポニカイネ 6 品種と IR64 等のインディカイネ 6 品種における全身感染性を調査した。その結果、F 系統は用いたジャポニカ 6 品種にはいずれも全身感染しなかった。また、インディカ 6 品種の中で Nona Bokra を除く 5 品種には全て全身感染した。これらインディカ 5 品種に種々の BMV 系統を接種した結果、F 系統の他に M2 系統と KU4 系統において 5 品種全てへの感染が認められた。興味深いことに、KU4 系統を接種した IR64 においてのみ激しい壊死病徴が観察された。一方、M2 系統を接種した IR64 では弱いモザイク病徴が見られたことから、これら 2 系統における病徴の違いに関わるウイルス因子を同定した。その結果、KU4 系統では RNA3 の CP 遺伝子中の変異によって開始コドンが変更され N 端 7 アミノ酸が欠失した短い CP が発現し、激しい病徴が IR64 で誘導されることが示唆された。ウイルス感染植物における壊死病徴発現には NLR 遺伝子を介した HR の機構が関わっている例が知られている (Pallas and Garcia, 2011)。この短い CP が IR64 イネに存在する未知の NLR タンパク質に認識されて壊死病徴を誘導している可能性がある。あるいは全長 CP では壊死病徴が見られないことから、N 端の 7 アミノ酸が短い CP 領域中に存在する標的構造を隠して NLR タンパク質からの認識を回避している可能性がある (Rao and Grantham, 1995)。あるいはイネの壊死病徴発現を抑制する機能があるかもしれない。

4. コシヒカリ由来の NLR 型 BMV 抵抗性遺伝子 *RBM1* の単離と BMV 病原力因子の解析

上記のように、BMV F系統（以下、BMV-F）はコシヒカリ等のジャポニカ全6品種にはいずれも全身感染せず、IR64やハバタキ等のインディカ5品種には全身感染した。つぎにBMV感染性の違いに関わるイネ因子を明らかにするため、コシヒカリとハバタキの染色体断片置換系統（Chromosome Segment Substitution Lines, CSSLs; ホンダ技術研究所）を利用した。コシヒカリのゲノムを背景にハバタキの部分的な染色体断片で置換した全36ラインのCSSLsにBMV-Fを接種し、全身感染を調査したところ、ひとつのラインのみで感染が見られた。このライン（H20）はコシヒカリの染色体を背景とし、第8染色体の一部がハバタキの染色体断片で置換されたラインであった。このH20とコシヒカリの交配後代F1の個体にBMV-Fを接種したところ、全ての個体で感染が見られなかったことから、この置換領域のコシヒカリ側の染色体上に顕性な抵抗性遺伝子が有ることが強く示唆された。さらにこの交配後代のF2植物個体におけるBMV-Fの感染性を調査し、DNAマーカーを用いたmap-based cloningを進めたところ、最終的に8番染色体の51-kbの領域に標的遺伝子を絞り込めた。この領域には7個の推定ORFが存在し、2個はN端にCC領域を持つNLR型タンパク質（CNL）をコードする遺伝子であった。それぞれのORFのプロモーター領域やターミネーター領域を含むと思われる上流、下流それぞれ約2.5 kbの領域を含めてPCRによりゲノム断片を増幅し、クローニングした。このゲノム断片をBMV感受性イネのラインH20に導入し、自殖次世代のBMV感受性を調査した結果、一方の遺伝子が導入された個体のみにおいてBMV抵抗性が付与された。他方のNLR遺伝子のゲノム断片が導入されたH20では抵抗性は付与されなかった。一方、このコシヒカリに由来するゲノム領域中のORFの配列をイネ品種日本晴のORFと比較した結果、全く同一であった。そこでつぎに日本晴にメチルニトロソウレアを用いて変異を導入した変異体集団から、本標的遺伝子中に変異をもつ系統を探索した結果、ミスセンス変異をもつ9ラインと終始コドンへのナンセンス変異を持つ1ラインを得た。これらにBMV-Fを接種したところ、ナンセンス変異を持つラインにおいてBMV感受性が確認された。以上の結果、コシヒカリや日本晴においてBMV抵抗性を付与するNLR型遺伝子が同定され、*RBM1* (*Resistance to brome mosaic virus 1*)と命名した。

*RBM1*のORFの直上流と直下流のプライマーを用いたゲノムPCRによって供試した12のイネ品種全てにおいてゲノム断片を増幅し、配列を比較解析した結果、3タイプに分類できた。コシヒカリと同一の配列を持つ“Kタイプ”，塩基配列やアミノ酸配列が大きく異なり、1個存在するイントロン配列がKタイプの配列よりも短いもののKタイプと同様に全長NLRタンパク質をコードする“Nタイプ”，さらにORFの中央における1塩基のナンセンス変異によって終始コドンが生じ、全長のNLRタンパク質を発現できない“Hタイプ”の3タイプが得られた。ジャポニカ6品種は全てKタイプに、インディカイネのNona BokraはNタイプ、それ以外のインディカイネ5品種は全てHタイプとなった。このことから、全長のNLRをコードすることがBMV抵抗性に必要であることが示された。

*RBM1*タンパク質に認識されるBMVの非病原力因子（Avr）を明らかにするために、*Nicotiana benthamiana*における一過的発現系によりNLRタンパク質とAvrが相互作用すれば細胞死が観察される系を用いて、*RBM1*をBMVの4個のタンパク質と個別に共発現させた。その結果、BMVの移行タンパク質(MP)である3aと*RBM1*を共発現した区においてのみ細胞死が誘導された。さらに、他の近縁のウイルスのMPについても同様の系で細胞死ア

ッセイを行った結果、BMVの全供試系統で、またBMVと同じプロモウイルスではbroad bean mottle virus (BBMV)を除いて他の5種のプロモウイルス全てのMPで細胞死が見られた。BMVと同じウイルス科に分類されるキュウリモザイクウイルス(CMV)や他のRNAウイルスのMPでは細胞死は見られなかった。さらに、BMV-Fの3aを短いペプチド断片とし、蛍光タンパク質mCherryとの融合タンパク質としてRBM1と共発現させた結果、3aタンパク質(全長303アミノ酸残基)のN端領域中の41アミノ酸残基だけでRBM1に認識され細胞死を誘導した。この領域にはBBMVやCMVにおいてもBMVの3aと類似した2次構造が推定されることから、Avrとして認識されるのはアミノ酸配列の違いであることが示唆された。

5. Shoni 由来の NLR 型 BMV 抵抗性遺伝子 *RBM2* の単離と BMV 病原力因子の解析

コシヒカリ由来の NLR 型 BMV 抵抗性遺伝子 *RBM1* を単離・同定し、12 品種の限られたイネ品種を用いた解析から *RBM1* は 3 タイプに分けられることが明らかとなった。更に *RBM1* の多様性を大規模に調査するため、世界 19 ヶ国から集められた約 4 万点の遺伝資源から、遺伝子の違い等に基づいて選抜された特徴的なイネ 69 品種である WRC (World Rice Core Collection, 農研機構)を用いて解析を進めた。WRC69 品種から *RBM1* を PCR で増幅し、上記の K, H, および N の 3 タイプに分けた。並行してそれら 69 品種の BMV 感受性も調査した結果、上述の限定されたイネ 12 品種では K タイプは全て BMV 抵抗性、H タイプは全て BMV 感受性であったのに対し、WRC69 品種を解析した結果、興味深いことに K タイプで感受性、H タイプで抵抗性という例外的な品種が多く見出された(図2)。

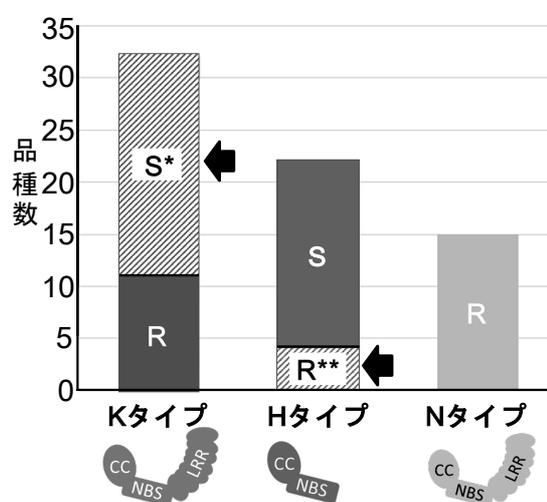


図2. WRC69品種を各々が有するRBM1によって分類した3タイプにおけるBMV抵抗性(R)と感受性(S)を示すイネ品種の数。矢印は例外的に感受性を示したKタイプと抵抗性を示したHタイプを表す。

Hタイプで抵抗性の品種については、ハバタキ等と同様に短いNLRタンパク質断片の発現が予想されるものの、N端領域に少数のアミノ酸置換が認められ、それが抵抗性に関与する可能性が考えられたが、形質転換イネの作出による機能解析によってその可能性は否定され、*RBM1*以外の別の抵抗性遺伝子(*RBM2*?)の存在が示唆された。一方、WRCのShoniとRatulという品種はShoniがBMV抵抗性でRatulがBMV感受性を示したものの、*RBM1*は両者で全く同一の塩基配列であり、コシヒカリの*RBM1*とは11アミノ酸の違いが見られた。Shoni由来の*RBM1*ゲノム断片で感受性イネ系統を形質転換した結果、抵抗性を付与できなかったことから、ShoniとRatulの*RBM1*は11アミノ酸の置換変異によってBMV抵抗性をイネに付与する能力を失っていることが示唆された。同時に、品種Shoniが示すBMV抵抗性は別の抵抗性遺伝子*RBM2*によることがさらに示唆された。

つぎに*RBM2*を単離するために組換え自殖系統群(RILs)を用いたGWAS解析の一種であるRaIDeN法(Shimizu *et al.*, 2022)を用いた。ヒトメボレはコシヒカリに近縁な品種で、両者は単一のBMV抵抗性遺伝子*RBM1*を有しており、BMV抵抗性である。また、Shoni

は上記のように BMV 感受性の *rbm1* と BMV 抵抗性を付与する *RBM2* を有すると考えられた。岩手生物工学研究センターで調製されたヒトメボレと Shoni の 117 系統の RILs イネ個体に BMV を接種し、感受性の RILs を 25 ライン特定した。これらのラインでは、ヒトメボレに由来する *RBM1* も Shoni に由来する *RBM2* も有していないことが予想された。並行して RNAseq 解析を行うことで、Shoni で発現している NLR 型の遺伝子を同定した。さらにこれらの BMV 感受性ラインの全ゲノム DNA 配列を決定し、親品種 Shoni と BMV 感受性ラインの間で異なる塩基配列をもち、かつ Shoni で発現している NLR 遺伝子を 3 個同定した。3 個共に染色体の近接した領域に存在していた。次にこれらの NLR 遺伝子の ORF を *N. benthamiana* を用いた細胞死アッセイに供試し、候補遺伝子の絞り込みを行った。Avr として BMV の 4 個の遺伝子も個別に発現させ、全体で 12 通りの組合せで細胞死アッセイを行った。その結果、Shoni 由来の特定の CNL 遺伝子 (*NLR2* と仮称) と 3a 遺伝子の組合せにおいてのみ細胞死が見られた。

NLR2 の ORF とその上流、下流それぞれ約 2.5kb をふくむゲノム断片を用いて、BMV 感受性イネ系統 H20 を形質転換した。その結果、導入遺伝子の確認された複数の形質転換体のライン全てにおいて BMV 抵抗性が見られた。対象区として作製した他の 2 個の *NLR* 遺伝子断片を導入した H20 においては BMV 抵抗性はみられなかった。一方、CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子編集によって Shoni 中の *NLR2* 遺伝子の破壊を試みた。ガイド RNA は *NLR2* の ORF の開始コドン近傍領域の配列を標的とし、オフターゲット効果による可能性を減らすため、3 種類設計した。結果的に 5 系統の遺伝子破壊系統が得られ、それらに BMV 接種試験を行ったところ、標的遺伝子のホモ変異体個体あるいはバイアレリック変異体は全て BMV 感受性を示した。以上の形質転換試験およびノックアウト試験により、*NLR2* が第 2 の BMV 抵抗性遺伝子 *RBM2* であることが示された。

NLR のタバコにおける細胞死誘導能とイネにおける抵抗性の発現は相関すると考えられたため、以下の実験を行った。まず、WRC 全 69 品種のうち、60 品種において *RBM2* の ORF を PCR 増幅できた。その内、抵抗性 6 品種は機能しない *rbm1* 遺伝子を有することが判明している。これら 6 品種から増幅した *RBM2* の細胞死誘導能を調査した結果、全て Avr である 3a 遺伝子との共発現において明瞭な細胞死を誘導した。一方、感受性でありながら *RBM2* 遺伝子が PCR 増幅できた 15 品種について同様に 3a 存在下における細胞死誘導実験を行ったところ、13 品種の *RBM2* では予想通り細胞死が誘導されず、種々のアミノ酸置換変異等によって *RBM2* が機能せず、感受性になっていることが示唆された。例外的に弱い細胞死を誘導した感受性 2 品種については、ORF の上流配列や下流配列を調査し Shoni の配列と比較したところ、約 100 塩基のトランスポゾン様配列の挿入や約 700 塩基の欠失が起こっていた。このことから、例外的な 2 品種ではイネにおいて *RBM2* が正常に発現制御されておらず、イネに抵抗性を付与できていないことが示唆された。

RBM2 においても *RBM1* と同様に BMV の 3a 移行タンパク質を Avr として認識している。認識範囲を調査した結果、*RBM1* と同様に BBMV を除く 5 種のプロモウイルスの 3a は認識したものの、CMV その他の RNA ウイルスの MP は認識しなかった。*RBM1* は BMV 3a の N 端領域の短いアミノ酸領域を認識することから、同様に様々な欠失変異体と *RBM2* の相互作用をタバコ細胞死アッセイによって調査した。その結果、*RBM1* と異なり、*RBM2* は 3a の短い断片を認識することはできなかった。3a は N 端と C 端に天然変性領域が存在

するが、これらの領域を欠失させた約 80%の中央領域には細胞死誘導活性が見られた。更に認識に重要な領域を特定するため、2 次構造の α -ヘリックスに注目し、推定 8 領域を個々に欠失した 3a と RBM2 の相互作用を調査した。その結果、7 番目の α -ヘリックスの欠失変異体 3a (以下, dA7) のみ細胞死誘導能を失い、この構造の重要性が示唆された。

RBM2 はN端にCCドメインを持つCNL (CC-NB-NLR) である。近年, RBM2と同様のCNLであるZAR1やSr35は, エフェクターの認識後活性化し, レジストソームと呼ばれる車輪様の5量体オリゴマーを形成することが示された (Förderer *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019a)。また, このレジストソームは細胞膜でCa²⁺チャンネルとして機能し, その活性はZAR1による細胞死と抵抗性の誘導に必要である (Bi *et al.*, 2021)。共免疫沈降実験によってdA7はRBM2と相互作用することが示された。そこで, dA7はRBM2と相互作用するもののRBM2のオリゴマー化を誘導できない可能性を考え, これをBlue Native PAGE (BN-PAGE)法によって調査した。ここで活性化後のRBM2の検出は, それが誘導する細胞死のために難航が予想された。そこで, ZAR1やナス科のヘルパーNLRであるNRC2における知見 (Contreras *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2020) を参考に, オリゴマー化はするが細胞死を誘導できないと予想されるMADA様モチーフ (Adachi *et al.*, 2019) の2アミノ酸変異体RBM2^{2E}を実験に用いた。3aまたはdA7をRBM2^{2E}とともに*N. benthamiana*で共発現し, 接種3日後の葉を用いてBN-PAGE解析を行った。その結果, RBM2は3a存在下においてオリゴマー化していることが示唆された。一方, dA7存在下ではRBM2^{2E}のオリゴマーと同様の位置にバンドはほとんど検出されなかったことから, dA7はRBM2のオリゴマー化を誘導できず, その結果RBM2による細胞死を誘導できないことが示唆された。また, 興味深いことに, 3aを検出した結果, RBM2^{2E}と同様の位置に高分子量のバンドが検出されたことから, RBM2は3aと共同でオリゴマーを形成していることが示唆された。

dA7で欠失している α -ヘリックス(A7)は3aのRNA結合ドメイン (Fujita *et al.*, 1998) 内に存在する。実際に, A7にはリシンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基が多く含まれ, それらのアラニン置換変異をもつ変異体BMVがキノアへの全身感染性を喪失する (Takeda *et al.*, 2004) ことは, 3aのRNA結合におけるA7の重要性を示唆する。このような3aの機能に重要な領域がRBM2の活性化に関与することは, 3aの機能を維持したままRBM2の活性化を誘導しないBMV変異体の出現を困難にしている可能性を推察させる。さらに, A7内のアミノ酸置換変異体3aは, *N. benthamiana*におけるRBM2共存下での細胞死誘導能を喪失したが, これらの変異3a遺伝子を持つ変異体BMVは, キノアやイネいずれの植物への感染性も喪失したことから, 3aの機能に重要な部位がRBM2の活性化に関与しているという仮説が支持された。

6. 最後に

様々な植物種で多くのNLR遺伝子が単離されてきたが, ウイルス抵抗性に関与するNLR遺伝子の数は多くない (Kapos *et al.*, 2019; Kourelis *et al.*, 2021)。単子葉植物ではさらに少なく, 2022年になって初めてウイルスに対する単子葉植物のNLR遺伝子が単離された。ミナトカモジグサ由来のBSR1はCNL をコードし, オオムギやコムギにbarley stripe mosaic virusに対する抵抗性を付与する (Wu *et al.*, 2022)。また, イネ由来のRYMV3はrice yellow mottle virusに対するCNLをコードする遺伝子である (Bonnamy *et al.*, 2023)。コムギのYm2

はwheat yellow mosaic virusの根部への感染を阻害するCNLをコードしている (Mishina *et al.*, 2023) . *BSR1*, *RYMV3*, *Ym2*および本研究で明らかとなった*RBM1*と*RBM2*は単子葉植物におけるウイルスに対するNLR型抵抗性遺伝子であり, 双子葉植物と同様に, 単子葉植物がウイルスに対してNLRを介した免疫機構を利用していることが示された.

BMVのF系統は北欧原産の牧草tall fescue から単離されたウイルスであり (Ding *et al.*, 2006), その分布がイネと異なることから自然界における両者の接触は無い可能性が高い. *RBM2*はイネに感染するBMVの3aに加え, BMV以外のプロモウイルス属のウイルスの3aを広く認識したことから, *BBMV*と比較してよりBMVに近縁な未知のウイルスが本来の標的である可能性がある. さらに, *RBM1*も全く同様の3aの認識範囲を示したことから, *RBM1*と*RBM2*の標的となる病原体は, 異なるウイルスではなく同様のウイルスである可能性がある. *RBM1*と相互作用するペプチドとして狭められた領域のアミノ酸配列を元に相同検索を行った結果, イネに感染する真正細菌の酵素遺伝子やイネに感染する真菌の推定タンパク質が候補として挙げられた. イネに感染できるBMV F系統の分布がイネの分布と重なるかについては未だ不明であり, 自然界で*RBM1*が認識して防御応答を誘導する対象はBMVに限らない可能性も考えられる.

BMVは, モデルRNAウイルスとしての重要性と比較して, これまで農作物に対する経済的重要性は低いと考えられてきた. しかし最近, 米国オハイオ州の小麦畑において, BMVのF系統と99%以上の配列同一性を持ったBMVのOhio系統 (BMV-OH) が, 繰り返し検出された. さらにBMV-OHは軟質赤色冬小麦 (SRWW) の収量を最大で61%も減少させたことから, BMVの流行がSRWW生産に深刻な被害を与える可能性が指摘された (Hodge *et al.*, 2019) . *RBM1*と*RBM2*は, BMVの全供試系統の3aを認識して細胞死を誘導したことから, BMV-OHを認識できると予想され, BMV抵抗性品種開発への利用が期待できる.

謝辞

本研究は, 京都大学植物病理学研究室の多くの修士・卒業生との共同研究の成果である. また, 研究の一部は独立行政法人日本学術振興会・科学研究費助成事業 (22380030, 16H04881, 22H02346) の支援で実施された. なお, BMVのF系統は米国The Samuel Roberts Noble FoundationのRichard S. Nelson博士, BMVのM1, M2系統は米国Wisconsin大学のPaul Ahlquist博士, その他のBMV系統は米国ATCCおよびドイツDSDM, コシヒカリ/ハバタキ染色体断片置換系統群の種子は株式会社本田技術研究所の高師知紀博士, 日本晴の塩基置換変異系統群から選抜した変異体は国立大学法人九州大学農学研究院 附属遺伝子資源開発研究センターの熊丸敏博教授, World Rice Core Collectionのイネ種子は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, ヒトメボレ/Shoni組換え自殖系統群の種子は公益財団法人岩手生物工学研究センターから分譲頂いた. ここに感謝申し上げます.

引用文献

Adachi, H., Contreras, M. P., Harant, A., Wu, C., Derevnina, L., Sakai, T., Duggan, C., Moratto, E., Bozkurt, T. O., Maqbool, A., Win, J. and Kamoun, S. (2019). An N-terminal motif in NLR immune receptors is functionally conserved across distantly related plant species. *eLife* 8: e49956.

- Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y., Dang, S., Xu, J., Hu, M., Wang, J., Zou, M., Deng, Y., Li, Q., Huang, S., Li, J., Chai, J., He, K., Chen, Y. and Zhou, J.-M. (2021). The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell* 184: 3528–3541.
- Bonnamy, M., Pinel-Galzi, A., Gorgues, L., Chalvon, V., Hébrard, E., Chéron, S., Nguyen, T. H., Poulicard, N., Sabot, F., Pidon, H., Champion, A., Césari, S., Kroj, T. and Albar, L. (2023). Rapid evolution of an RNA virus to escape recognition by a rice nucleotide-binding and leucine-rich repeat domain immune receptor. *New Phytol.* 237: 900–913.
- Contreras, M. P., Pai, H., Tumtas, Y., Duggan, C., Yuen, E. L. H., Cruces, A. V., Kourelis, J., Ahn, H.-K., Lee, K.-T., Wu, C.-H., Bozkurt, T. O., Derevnina, L. and Kamoun, S. (2022). Sensor NLR immune proteins activate oligomerization of their NRC helpers in response to plant pathogens. *EMBO J.* 42: e111519.
- Ding, X. S., Schneider, W. L., Chaluvadi, S. R., Mian, M. A. and Nelson, R. S. (2006). Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 1229–1239.
- Förderer, A., Li, E., Lawson, A. W., Deng, Y., Sun, Y., Logemann, E., Zhang, X., Wen, J., Han, Z., Chang, J., Chen, Y., Schulze-Lefert, P. and Chai, J. (2022). A wheat resistosome defines common principles of immune receptor channels. *Nature* 610, 532–539.
- Fujisaki, K., Hagihara, F., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2003). Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus, a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Virol.* 148: 165–175.
- Fujita, M., Mise, K., Kajiura, Y., Dohi, K. and Furusawa, I. (1998). Nucleic acid-binding properties and subcellular localization of the 3a protein of brome mosaic bromovirus. *J. Gen. Virol.* 79: 1273–1280.
- Fujita, Y., Fujita, M., Mise, K., Kobori, T., Osaki, T. and Furusawa, I. (2000). Bromovirus movement protein conditions for the host specificity of virus movement through the vascular system and affects pathogenicity in cowpea. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1195–1203.
- Hodge, B. A., Salgado, J. D., Paul, P. A. and Stewart, L. R. (2019). Characterization of an Ohio isolate of brome mosaic virus and its impact on the development and yield of soft red winter wheat. *Plant Dis.* 103: 1101–1111.
- Hu, M., Qi, J., Bi, G. and Zhou, J.-M. (2020). Bacterial effectors induce oligomerization of immune receptor ZAR1 in vivo. *Mol. Plant* 13, 793–801.
- Iwahashi, F., Fujisaki, K., Kaido, M., Okuno, T. and Mise, K. (2005). Synthesis of infectious *in vitro* transcripts from *Cassia yellow blotch bromovirus* cDNA clones and a reassortment analysis with other bromoviruses in protoplasts. *Arch. Virol.* 150: 1301–1314.
- Kaido, M., Inoue, Y., Takeda, Y., Sugiyama, K., Takeda, A., Mori, M., Tamai, A., Meshi, T., Okuno, T. and Mise, K. (2007). Downregulation of the *NbNACa1* gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of *Brome mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 671–681.
- Kao, C. C. and Sivakumaran, K. (2000). Brome mosaic virus, good for an RNA virologist's basic needs. *Mol. Plant Pathol.* 1: 91-97.

- Kapos, P., Devendrakumar, K. T. and Li, X. (2019). Plant NLRs: From discovery to application. *Plant Sci.* 279, 3–18.
- Kourelis, J., Sakai, T., Adachi, H. and Kamoun, S. (2021). RefPlantNLR is a comprehensive collection of experimentally validated plant disease resistance proteins from the NLR family. *PLoS Biol.* 19: e3001124.
- Mishina, K., Suzuki, T., Oono, Y., Yamashita, Y., Zhu, H., Ogawa, T., Ohta, M., Doman, K., Xu, W., Takahashi, D., Miyazaki, T., Tagiri, A., Soma, C., Horita, H., Nasuda, S., De Olivwira, R., Paux, E., Chen, G., Pourkheirandish, M., Wu, J., Liu, C. and Komatsuda, T. (2023). Wheat *Ym2* originated from *Aegilops sharonensis* and confers resistance to soil-borne *Wheat yellow mosaic virus* infection to the roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 120: e2214968120.
- Narabayashi, T., Iwahashi, F., Kaido, M., Okuno, T. and Mise, K. (2009). *Melandyrium yellow fleck bromovirus* infects *Arabidopsis thaliana* and has genomic RNA sequence characteristics that are unique among bromoviruses. *Arch. Virol.* 154: 1381–1389.
- Nouairy, A. O. and Ahlquist P. (2003). Brome mosaic virus RNA replication: Revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annu Rev. Phytopathol.* 41: 77-98.
- Okinaka, Y., Mise, K., Okuno, T. and Furusawa, I. (2003). Characterization of a novel barley protein, HCP1, that interacts with the *Brome mosaic virus* coat protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 352–359.
- Pallas, V. and García, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92: 2691–2705.
- Rao, A. L. N. and Grantham, G. L. (1995). Biological significance of the seven amino-terminal basic residues of brome mosaic virus coat protein. *Virology* 211: 42–52.
- Shimizu, M., Hirabuchi, A., Sugihara, Y., Abe, A., Takeda, T., Kobayashi, M., Hiraka, Y., Kanzaki, E., Oikawa, K., Saitoh, H., Langner, T., Banfield, M.J., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2022). A genetically linked pair of NLR immune receptors shows contrasting patterns of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119: e2116896119.
- Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T. and Mise, K. (2004). The C terminus of the movement protein of *Brome mosaic virus* controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *J. Gen. Virol.* 85: 1751–1761.
- Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H.-W., Zhou, J.-M. and Chai, J. (2019a). Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* 364: eaav5870.
- Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Wang, H.-W., Zhou, J.-M. and Chai, J. (2019b). Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* 364: eaav5868.
- Wu, Q., Cui, Y., Jin, X., Wang, G., Yan, L., Zhong, C., Yu, M., Li, W., Wang, Y., Wang, L., Wang, H., Dang, C., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, P., Zhao, X., Wu, J., Fu, D., Xia, L., Nevo, E., Vogel, J., Huo, N., Li, D., Gu, Y. D., Jackson, A. Q., Zhang, Y. and Liu, Z. (2022). The CC–NB–LRR protein BSR1 from *Brachypodium* confers resistance to *Barley stripe mosaic virus* in gramineous plants by recognising TGB1 movement protein. *New Phytol.* 236: 2233–2248.

野外トランスクリプトームデータを利用した

植物病原体の診断と発生調査

津島 綾子

Tsushima, A.

Diagnosis and surveillance of plant pathogens using field transcriptome data.

Abstract

Emerging pathogens pose a serious threat to food security. Field pathogenomics is a genotyping technique based on RNA-seq data generated directly from pathogen-infected plant samples collected in the field. This method allows the rapid and accurate analysis of pathogen population dynamics. Field pathogenomics was recently applied to investigate wheat stem rust that occurred in Ireland in 2020. The study revealed that the Irish isolates were genetically close to the isolates from the United Kingdom and Ethiopia, which were previously designated to the epidemic TKTTF race. This finding highlights the need to re-initiate resistance breeding for this re-emerging pathogen across western Europe. For further efficient monitoring of plant diseases, in addition to improving diagnostic tools, it is essential to make next generation sequencing (NGS) data publicly available, as this will facilitate characterizing plant pathogens at the global scale.

Keywords: Next generation sequencing (NGS), field RNA-seq, phylogenetic analysis, fungicide resistance, wheat rust

大阪公立大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Osaka
Metropolitan University

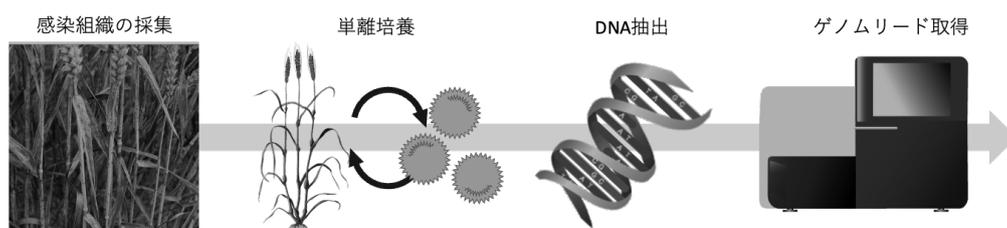
1 はじめに

新興病原体は食料安全保障における重大な脅威である。ヨーロッパのセイヨウトネリコに発生した *ash dieback* や、アフリカと中東におけるコムギ黒さび病に見られるように、新興病原体の発生は、既知の病原体の生息域の拡大や病原性の変化に起因する(Singh et al. 2011; McMullan et al. 2018)。植物病害が発生した際には、病徴をよく観察し、栽培管理状況を正しく把握した上で、原因を素早く予測することが重要である(Riley et al. 2002)。その上で、診断を確定させ、より詳細な情報を得るため、様々な分子診断技術が開発されてきた。例えば、病原体の分類やレース、殺菌剤感受性を判別する PCR マーカーは広く利用されている(Dita et al. 2010; Furuya et al. 2010; Gan et al. 2017)。ただし、このような特定のゲノム配列を取り出して解析する方法は既知の病原体やゲノム変異には有用だが、未知の病原体系統は検出できない点に注意が必要である(Naccache et al. 2014)。次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing, NGS) 技術は、生物のゲノムあるいはトランスクリプトームデータの網羅的な取得を可能にする。病原体の特徴を一挙に捉えられる利点を生かし、近年では NGS データを用いた植物病害の診断や発生調査も行われるようになってきている。本稿では、野外トランスクリプトームデータを利用した植物病原体のジェノタイピング法に焦点を当て、その原理や活用事例を紹介する。

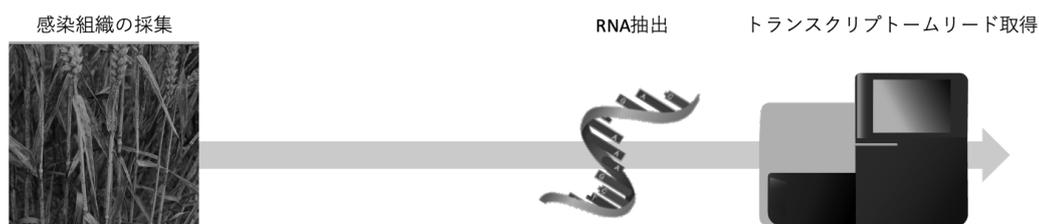
2 Field pathogenomics とは

病害診断に用いる NGS データは一般に図 1 a のように取得される。1) 感染組織を取得する。2) 病原体を単離培養する。3) 培養した病原体からゲノム DNA を

(a) 従来法



(b) Field pathogenomics



Images © 2016 DBCLS Togo TV, CC-BY-4.0

図 1. NGS データを用いた病害診断。(a)ゲノムリードを用いる通常の方法。(b)Field pathogenomics では、圃場で採集した感染組織から直接トランスクリプトームリードを取得することで、診断に要する時間を短縮できる。

抽出する。4) ライブラリを作成し、次世代シーケンサーを用いてゲノムリードを得る。上記の工程において、植物病原体の種類によっては 2)の単離培養が迅速な診断のボトルネックになることも多い。例えば、絶対寄生菌は培地上で生育しないため、感受性の宿主植物に接種を繰り返し、ゲノム DNA 抽出に十分な量の胞子を確保する必要がある。コムギさび病を引き起こす *Puccinia* 属菌の場合、このステップに半年以上かかることもある。

絶対寄生菌の診断と発生調査をより迅速に行うため、**field pathogenomics**が開発された(Hubbard et al. 2015)。本法と従来法を比較した際の重要な違いは2点ある(図 1b)。1つ目は、単離培養を行わずに圃場で採取した罹病組織をそのまま用いる点である。これは感染組織に含まれる病原体がクローンで増殖し同一のゲノムを持つことを前提としている。2つ目は、RNA からトランスクリプトームリードを取得し解析する点である。感染組織のショットガンメタゲノムに含まれる病原体リードを解析することも理論上不可能ではないが、**field pathogenomics** は高発現遺伝子の情報にフォーカスすることで解析に必要な病原体リード量の確保を容易にしている。この手法により行われたコムギ黄さび病菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) の系統解析の結果は、従来のゲノムリードを用いた方法と同等であることが示されている(Hubbard et al. 2015)。

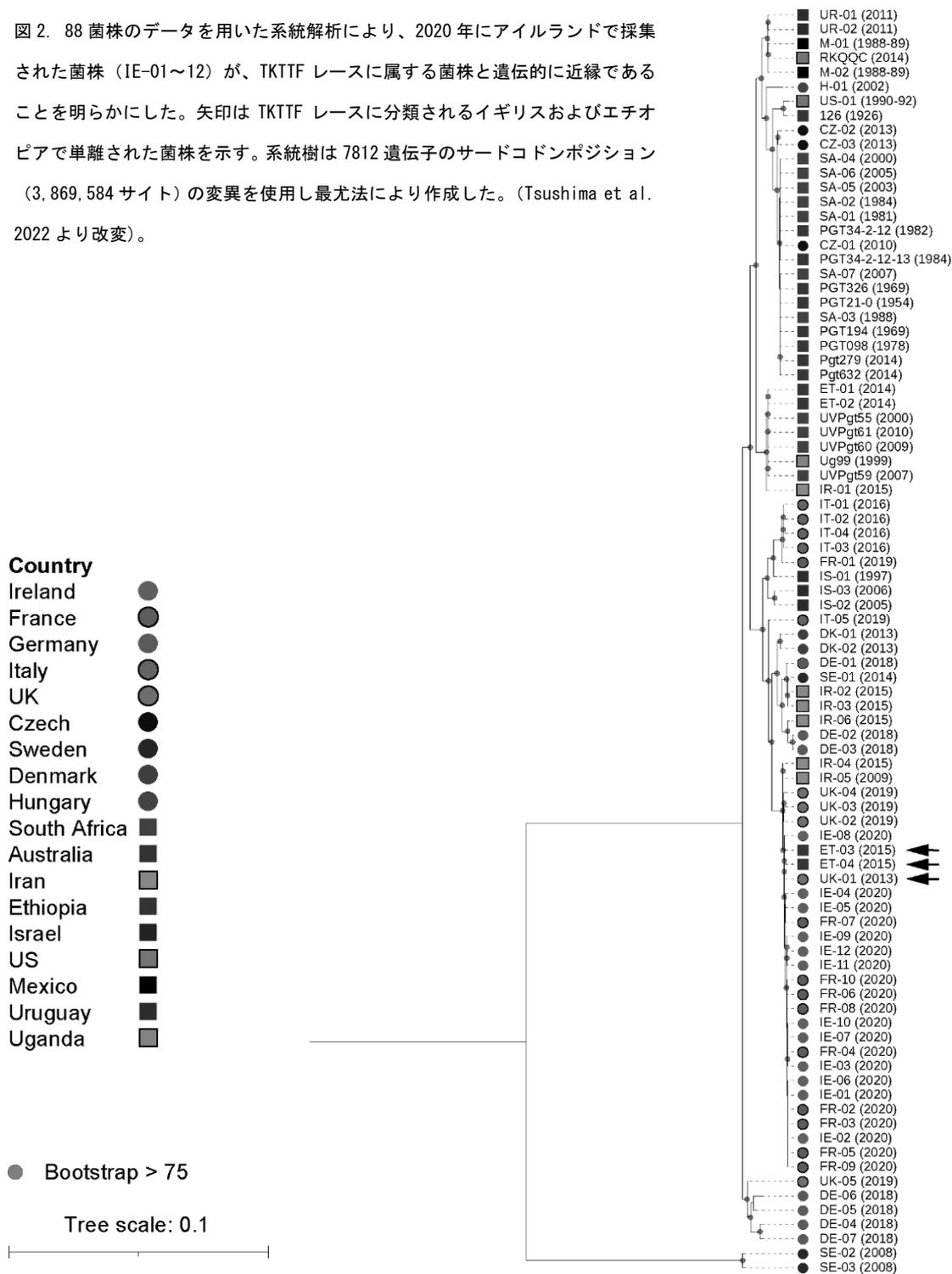
3 Field pathogenomics の活用事例

ここでは、**field pathogenomics** の活用事例として、アイルランドで発生したコムギ黒さび病 (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) に関する研究を紹介する(Tsushima et al. 2022)。ウガンダで発見された強病原性レース Ug99 に代表されるように、この病原菌はアフリカを中心にコムギ生産に大きな被害をもたらしている(Savary et al. 2019)。しかし、2013年イギリスで68年ぶりに発生が確認されたのを皮切りに(Lewis et al. 2018)、ヨーロッパにおける本病原菌の分布は拡大傾向にある(Patpour et al. 2022)。こうした状況の中、2020年夏にアイルランドで約50年ぶりにコムギ黒さび病の発生が確認された。

新たに発生したコムギ黒さび病菌の遺伝的起源を探るため、5つの試験圃場から12の罹病葉サンプルを取得しトランスクリプトームリードを得た。このデータと過去に別の地域で取得された76菌株のデータを用いて、**field pathogenomics** による集団遺伝学的解析を行なった。その結果、アイルランドで取得された菌株は2013年にイギリスで単離された菌株および2015年にエチオピアで単離された菌株と遺伝的に近いことを明らかにした(図2)。このデータは、アイルランドのコムギ黒さび病菌が隣接するヨーロッパ諸国から風に乗って運ばれてきた可能性を示唆する。イギリスとエチオピアで単離された菌株は、

いずれもレース検定により TKTF レースに属することが明らかにされている (Olivera et al. 2015; Lewis et al. 2018)。これらと近縁なアイルランドの菌株も

図 2. 88 菌株のデータを用いた系統解析により、2020 年にアイルランドで採集された菌株 (IE-01~12) が、TKTF レースに属する菌株と遺伝的に近縁であることを明らかにした。矢印は TKTF レースに分類されるイギリスおよびエチオピアで単離された菌株を示す。系統樹は 7812 遺伝子のサードコドンポジション (3,869,584 サイト) の変異を使用し最尤法により作成した。(Tsushima et al. 2022 より改変)。



同レースであるか確認するために接種試験を行なったところ、同様に TKTTF レースに分類された。このように、少なくともコムギ黒さび病菌の場合、系統解析の結果と表現型はある程度関連する。従って、集団内の系統関係を詳細に明らかにすることで、次年度以降の栽培品種を選定する際の判断材料を提供できると考えている。しかしながら、イギリスを含む西ヨーロッパ諸国ではコムギ黒さび病が長年わたり発生していなかったため、抵抗性品種の開発は積極的に行われていない。実際、イギリス国内で栽培が奨励されているコムギ品種の 80%以上は TKTTF レースに感受性である(Lewis et al. 2018)。今後、コムギ黒さび病をターゲットとしたコムギの品種改良が再開されることが望まれる。

調査を行なったアイルランドの 5 つの試験圃場において、コムギ黒さび病が発生したのは全て殺菌剤を散布しないコントロール区画であった。殺菌剤の標的として知られる SdhB, SdhC, SdhD および Cyp51 をコードする遺伝子上の非同義置換を先述のトランスクリプトームデータを用いて調査した結果、耐性に関わる既知の変異は検出されなかった。このことは、殺菌剤の散布がコムギ黒さび病の流行を抑制している可能性を示唆する。しかし、近縁のダイズさび病菌 (*Phakopsora pachyrhizi*) やコムギ黄さび病菌では殺菌剤耐性に関わる変異を持つ系統が既に発見されているため(Simões et al. 2018; Cook et al. 2021)、コムギ黒さび病菌に同様の変異が生じるリスクは否定できない。コムギ黒さび病菌がアイルランドを含む西ヨーロッパに定着する可能性に備え、殺菌剤と抵抗性品種の両軸で対策を進めていく必要があるだろう。

この他、バングラデシュでコムギいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) が発見された際にも本法が利用された(Islam et al. 2016)。単離培養の省略によるスピーディなデータ取得に加え、各国の専門家の協働が功を奏し、病害発生から約 8 ヶ月で解析結果が論文として公開された。このように、絶対寄生菌でなくとも特に迅速かつ詳細な解析が必要とされる場面で、field pathogenomics の利用価値は大きいと考えられる。

4 NGS データを用いた診断・発生調査の効率化に向けて

Field pathogenomics は野外病原体の強力なジェノタイピング手法だが、改善の余地もある。本法では、病徴が見られる感染組織を切り取り、そのトランスクリプトームデータを取得する。そのうち、病原体リファレンスゲノムへマップされるリードの割合は 30 %程度に留まる(Tsushima et al. 2022)。このことは取得したデータの大半は解析に使われないことを意味する。NGS データを用いた診断や発生調査をより効率的かつ安価に行うため、我々は field pathogenomics の改良に取り組んでいる。絶対寄生菌の多くは、感染が進むにつれ宿主植物上で大量の胞子を形成する。この特性を利用し、我々は感染組織表面の組織を選択的に取得する

ことで、サンプル中の絶対寄生菌の割合を増加させる手法を確立した（木田ら未発表データ）。この方法を用いると、リファレンスゲノムへマップされる病原体リードの割合は約 90%まで改善できる。従って、従来並みの解析クオリティを保ちつつ、取得リード数を半分以下に削減できると期待される。今後はこのサンプリング法で取得したデータを用いて、系統解析や殺菌剤の標的をコードする遺伝子上の変異の解析を進めていきたい。

5 おわりに

大量の NGS データは病原体の正確な診断と発生調査に必要不可欠である。これらはどのように生成、管理、そして利用されるべきなのだろうか？一つの研究グループが収集・処理できるデータの種類や量には限界がある。従って、自分達でオリジナルデータを取得し、公共データと共に解析する、というスタイルが現実的な解決策になると筆者は考える。公共データベースに保存された NGS データは、様々な植物病原体を調査する際の格好のリソースである。公共データを活用すれば、自分では調査できない世界の裏側で発生した病原体の情報も解析できるのだ。実際に、Tsushima et al. 2022 では自分達で収集したデータセットと公共データを組み合わせて解析を行い、コムギ黒さび病菌の拡散経路を提唱できた。このように公共 NGS データは研究者にとって魅力的だが、アーカイブされているデータがそれぞれ異なる方法で取得されていること、さらに、取得方法によるバイアスを減らすためデータセットの選別がしばしば必要なことを理解して使用する必要がある(Sielemann et al. 2020)。また、研究成果を公表する際には、多くの研究雑誌でオリジナルデータの公開が義務付けられている。その際、配列情報と共に詳細かつ正確なメタデータを提供することが非常に重要である。収集日や場所、宿主植物、核酸の抽出方法といったデータの周辺情報は、将来データを利用しようとする研究者を助け、最終的に公開したデータの価値を最大化してくれる(Wilkinson et al. 2016)。NGS データの活用により、植物病害の研究コミュニティがさらに発展し、新たな発見がもたらされる未来を期待したい。

謝辞

サンプルを提供いただいた全ての方々に感謝申し上げます。本稿で紹介した研究の一部は、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所が有する遺伝研スーパーコンピュータシステムを利用しました。

引用文献

- Cook NM, Chng S, Woodman TL, et al (2021) High frequency of fungicide resistance-associated mutations in the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Pest Management Science* 77:3358–3371.
- Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, et al (2010) A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology* 59:348–357.
- Furuya S, Mochizuki M, Saito S, et al (2010) Monitoring of QoI fungicide resistance in *Plasmopara viticola* populations in Japan. *Pest Management Science* 66:1268–1272.
- Gan P, Nakata N, Suzuki T, Shirasu K (2017) Markers to differentiate species of anthracnose fungi identify *Colletotrichum fructicola* as the predominant virulent species in strawberry plants in Chiba Prefecture of Japan. *Journal of General Plant Pathology* 83:14–22.
- Hubbard A, Lewis CM, Yoshida K, et al (2015) Field pathogenomics reveals the emergence of a diverse wheat yellow rust population. *Genome Biology* 16:23.
- Islam MT, Croll D, Gladieux P, et al (2016) Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Biology* 14:84.
- Lewis CM, Persoons A, Bebber DP, et al (2018) Potential for re-emergence of wheat stem rust in the United Kingdom. *Communications Biology* 1:13.
- McMullan M, Rafiqi M, Kaithakottil G, et al (2018) The ash dieback invasion of Europe was founded by two genetically divergent individuals. *Nature Ecology & Evolution* 2:1000–1008.
- Naccache SN, Federman S, Veeraraghavan N, et al (2014) A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Research* 24:1180–1192.
- Olivera P, Newcomb M, Szabo LJ, et al (2015) Phenotypic and Genotypic Characterization of Race TKTTF of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that Caused a Wheat Stem Rust Epidemic in Southern Ethiopia in 2013–14. *Phytopathology*® 105:917–928.
- Patpour M, Hovmøller MS, Rodriguez-Algaba J, et al (2022) Wheat Stem Rust Back in Europe: Diversity, Prevalence and Impact on Host Resistance. *Frontiers in Plant Science* 13: 882440.
- Riley M, Williamson M, Maloy O (2002) Plant Disease Diagnosis. The Plant Health Instructor. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>

- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, et al (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution* 3:430–439.
- Sielemann K, Hafner A, Pucker B (2020) The reuse of public datasets in the life sciences: potential risks and rewards. *PeerJ* 8:e9954.
- Simões K, Hawlik A, Rehfus A, et al (2018) First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 125:21–26.
- Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, et al (2011) The Emergence of Ug99 Races of the Stem Rust Fungus is a Threat to World Wheat Production. *Annual Review of Phytopathology* 49:465–481.
- Tsushima A, Lewis CM, Flath K, et al (2022) Wheat stem rust recorded for the first time in decades in Ireland. *Plant Pathology* 71:890–900.
- Wilkinson MD, Dumontier M, Aalbersberg IJJ, et al (2016) The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Scientific data* 3:160018.

ダイズ立枯性病害防除に関する研究

小林光智衣

Kobayashi, M.

Research on control of soil-borne disease of soybean

Abstract

Among various diseases that cause damage to soybean, soil-borne diseases are the most serious in Japan. One of the reasons is that approximately 80% of soybean cultivation is done in converted paddy fields. Among soil-borne diseases, red crown rot (RCR, caused by *Calonectria ilicicola*) and Phytophthora root and stem rot (PRR, caused by *Phytophthora sojae*) are serious and widespread diseases in Japan. One of the most effective strategies for disease control is use of disease resistance genes. We focus on analysis of resistance genes and development of resistant crops by modification of susceptibility (*S*) genes. 1) RCR: So far, no RCR-resistant cultivar has been found in soybean. We have identified three quantitative trait loci (QTLs) contributing to resistance to RCR in wild soybean. We are developing soybean lines introduced with the QTLs. 2) PRR: Fukuyutaka is a broad-spectrum resistant cultivar to PRR. There are at least three loci that contribute to PRR resistance, and the locus on chromosome 15 has the most significant contribution. We are in the process of identifying resistance genes on chromosome 15. We performed whole genome analysis and fine mapping to identify resistance genes. 3) In soybean, there have been few reports of resistance conferred by modification of *S* genes. Recently, it has been reported that knock out of *GmTAPI*, a target of PRR virulence effector, confers resistance without compromising agronomic traits. It is expected that new resistance crops by modifying the *S* genes will be developed in soybean.

Key words: soil-borne disease of soybean, red crown rot, Phytophthora root and stem rot, susceptibility genes

¹ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan

はじめに

日本のダイズ栽培は、約 80%が水田転換畑で行われているため排水性が十分でない圃場も多く、立枯性病害の発生・被害が深刻である。立枯性病害とは立ち枯れ症状を引き起こす土壌病害の総称である。12 種類の病原体により引き起こされることが分かっており、そのうち黒根腐病、茎疫病、白絹病の 3 種が特に重要な病害として認識されている（西、2008）。本稿では、既存の遺伝資源を利用した黒根腐病および茎疫病抵抗性品種育成に向けた取り組みについて紹介したい。

1. 野生種ツルマメの遺伝資源を利用した黒根腐病抵抗性ダイズ品種の開発

ダイズ黒根腐病は、土壌糸状菌である *Calonectria ilicicola* により引き起こされる立枯性病害の一つである。日本では北海道から九州まで全国的に発生が確認されており、特に東北・北陸地域での被害が大きい。黒根腐病菌に感染したダイズは根が腐敗して早期落葉・早熟となるため減収の一因となるほか、しわ粒の増加で品質が低下する。重症の場合には根が壊死して株全体が枯死するが、多くの場合病徴が目立たないため、気づかないうちに圃場に蔓延し減収となっている場合が多いと考えられる。感染個体の根の皮層部には耐久性の微小菌核が形成され、それが翌年以降の一次感染源となる。ダイズの黒根腐病抵抗性品種は見つかっておらず、効果的な殺菌剤もないため、一度発生すると防除が難しい病害である。

黒根腐病抵抗性の育種素材を探索する目的で、農研機構遺伝資源研究センターに保存されたダイズミニコアコレクション（国内 79 系統、海外 80 系統）とダイズ野生種であるツルマメミニコアコレクション（54 系統）の黒根腐病抵抗性が調査された（Jiang et al., 2020）。ダイズでは系統によって感受性に違いが見られるものの、抵抗性品種といえるほどの系統は存在しなかった（図 1 A,B）。また、日本国内系統よりも海外系統の方が感受性が高い傾向が見られた。一方、ツルマメの中には明らかに抵

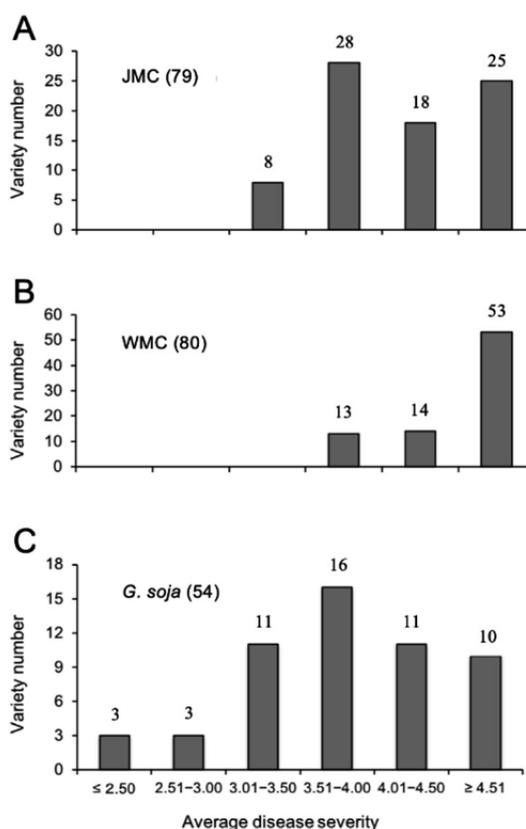


図 1. 国内ダイズ系統 (JMC)、海外ダイズ系統 (WMC) および野生種ツルマメ系統 (*G. soja*) に黒根腐病菌を接種し、病徴を 0~5 の 6 段階で評価した。数値が大きいほど感受性が高いことを示す。(Jiang et al., 2020 より引用)

抗性程度の強い系統がみつかった（図 1 C）。ツルマメはダイズと交配可能であり、黒根腐病抵抗性品種の遺伝資源として利用可能であると考えられた。

現在、黒根腐病抵抗性品種の育成を目指し、ツルマメの抵抗性遺伝子座のダイズ栽培品種への導入を進めている。黒根腐病に対して強い抵抗性を示すツルマメ 3 系統（Gs-7、Gs-9、Gs-27）と主要栽培品種であるエンレイ、およびゲノム情報が整備された Williams 82 との交配系統を使った遺伝解析から、ツルマメ由来の 4 つの抵抗性遺伝子座（*qRci1*、*qRci2*、*qRci3*、*qRci4*）が同定された。このうち *qRci1*、*qRci2*、*qRci4* はエンレイが保持しない抵抗性遺伝子であると考えられたため、これらを導入することで抵抗性の強化が期待できる。これまでに、連続戻し交配および DNA マーカー選抜を繰り返すことで、各 *qRci* 遺伝子座を導入した中間母本を作出し、黒根腐病室内検定で抵抗性の向上を確認した。今後は、各遺伝子座の集積を進め、抵抗性が強化されたダイズ新品種の開発をめざす。

2. ダイズ茎疫病抵抗性遺伝子の同定と育種利用

ダイズ茎疫病は *Phytophthora sojae* によって引き起こされる土壌病害である。茎疫病の発生は 1950 年代に米国オハイオ州で確認され、その後アルゼンチン、オーストラリア、ブラジル、中国などで発生が報告されている（Schmitthenner and Dorrance, 2015）。日本では 1977 年に北海道で発生が報告され（土屋、1982）、現在までに全国各地で発生が確認されている。全生育期間にわたって発生するが、特に播種後から生育初期に発生し被害を引き起こす。排水の悪い多湿環境では発病を助長し、急速に萎凋・枯死にいたるため、難防除病害の一つとなっている。

2-1. 真性抵抗性遺伝子を利用した抵抗性品種の育種

茎疫病の対策は、排水対策や殺菌剤による化学的防除のほか、抵抗性品種の利用が有効な防除法とされる。茎疫病菌はレース分化が知られており、米国では主要な抵抗性遺伝子を導入した品種育成が実践されてきた（Schmitthenner and Dorrance, 2015）。これまでに、少なくとも 40 の抵抗性遺伝子（*Rps*: Resistance to *Phytophthora sojae*）あるいは対立遺伝子の存在が報告されている（Lin et al., 2022）。米国では、8 つの *Rps* 遺伝子（*Rps1a*、*Rps1b*、*Rps1c*、*Rps1d*、*Rps1k*、*Rps3a*、*Rps6*、*Rps7*）を持つ判別品種に対する病原性パターンにより 55 レースが同定されている（Grau et al., 2004）。日本でもレース分化が確認されているが、土屋ら（1990）が北海道において米国の分類に基づいたレース判別を実施したところ、ほとんどの菌株は米国の 55 レースには分類されなかった。そこで日本の 6 品種を判別品種として選定し、これらに対する病原性から 10 レースに分類した（土屋ら、1990）。兵庫県では、県内で分離された 51 菌株を上記 6 品種を用いて検定し、北海道のレースとは異なる 4 レースを含む 8 レースに分類した（Sugimoto et al., 2006）。このように、病原性のパターンは国内でも地域ごとに異なっており、北海道から山口県までの 14 道県から収集された茎疫病菌 109 菌株を調査した研究

では、少なくとも 59 の病原性パターンに分かれることがわかっている（森脇、2010）。したがって、抵抗性品種の育成は栽培地域の主要なレースを調査した上で適切な抵抗性品種を選定することが理想である。既知の *Rps* のうち、*Rps1d* と *Rps1k* を持つ品種は 109 菌株のうちの 80%以上の菌株に対して抵抗性を示したことから、抵抗性遺伝資源として有効である（森脇、2010）。日本産ダイズ品種の多くは既知の *Rps* 以外にも複数の抵抗性遺伝子を持つと推定され（高橋ら、2019）、日本産ダイズ品種であるワセシロゲと東山 231 号の抵抗性遺伝子領域が同定されている（Sugimoto et al., 2011; Matsuoka et al., 2021）。

2-2. ダイズ茎疫病圃場抵抗性遺伝子の解析

真性抵抗性は打破菌株の出現リスクがあり、一つの真性抵抗性の有効性は 8～20 年と言われている（Grau et al., 2004）ことから、広範囲なレースに対する発病抑制効果が期待される圃場抵抗性が注目されている。北海道では 1999 年から圃場抵抗性検定法の開発と圃場抵抗性品種の選抜が実施されている。2005 年からの 3 か年にわたり北海道主要ダイズ 11 品種について圃場抵抗性検定を行った結果、‘中系 173 号’では 60%かそれ以上の個体が枯死した一方、‘ユウヒメ’、‘幌加内在来’等ではほとんど枯死個体は見当たらなかった（山下、2008）。供試品種の抵抗性評価は真性抵抗性の有無とは一致せず、これらは圃場抵抗性を有すると考えられた。

圃場抵抗性、および部分抵抗性に寄与する遺伝子座に関する研究は多くの報告があるが、原因遺伝子や抵抗性機構が解明された例はない。杉本ら（2013）は、圃場抵抗性の有望な育種母本である「フクユタカ」と感受性品種「ヒメシラズ」との組換え自殖系統（RILs）145 系統を用いて抵抗性検定と遺伝解析を行った。その結果、フクユタカは複数の抵抗性遺伝子を持つことが示唆された。このうち、最も効果が高い第 15 番染色体の QTL 領域はこれまで報告がなく、新規抵抗性遺伝子であると考えられた。フクユタカは病原性の異なる菌株（N1、HR1、Th1）に対して中程度の抵抗性を示した（Jiang et al., 2017）。また、フクユタカの抵抗性は米国で代表的な圃場抵抗性品種である Conrad と比較して同等か強い抵抗性であると示唆された（杉本ら、2013; Jiang et al., 2017）。現在、高精度マーカーの開発と抵抗性品種の育成を目指して、フクユタカの第 15 番染色体に座乗する抵抗性遺伝子の単離と機能解析を進めている。

3-1. 病害感受性遺伝子の改変による新規抵抗性遺伝資源の開発

作物の病害防除において、耐病性品種の利用は農薬使用量を減らすことができるためコストや労力を削減できるという利点がある。一方で、圃場で問題となる病害は単一ではなく、それぞれの病害に対応した抵抗性遺伝子を育種で導入するのは大変な作業である。また、有効な抵抗性遺伝資源が見つからない病害も多い。

病害感受性遺伝子（Susceptibility gene : *S* 遺伝子）は、機能を欠損することで

病害抵抗性が付与される遺伝子であり、遺伝子破壊により抵抗性を獲得する変異体のターゲットとして研究されてきた。*S* 遺伝子は、抵抗性付与のメカニズムから大きく二つに分けられる。一つは病原体が宿主に感染する際に必要となる宿主因子であり、ポテトウイルスの翻訳開始複合体形成に必要な *eIF4E* (Sanfaçon, 2015) や、イネ白葉枯病菌が分泌する病原性エフェクターによって発現誘導される *SWEET* 遺伝子 (Ginny et al., 2010) 等が含まれる。これら病原体のターゲットとなる宿主因子は機能の特異性が高く、欠損しても生育等の農業形質に影響しない場合が多いため、ゲノム編集により作られた耐病性植物の成功例も複数報告されている。もう一つは、欠損することで植物体に恒常的な抵抗反応が誘導される遺伝子である。代表的なものはオオムギで発見された *MLO* 遺伝子で、機能欠損により広範囲なうどんこ病に抵抗性が付与される (Kusch and Panstruga, 2017)。後者のような *S* 遺伝子は、広範囲な病原体に対する抵抗性の付与が期待できる一方、恒常的な抵抗性誘導により生育不良を伴う場合が多く、実用化できる変異体は限られていた。しかし、近年のゲノム編集技術の進歩によって、変異の挿入パターンを調整することで、生育阻害を限定的にして抵抗性が付与することがわかってきた。例えば、ゲノム編集によって *MLO* 遺伝子に 48 塩基の欠失を導入したトマトや、*MLO-B1* 遺伝子座に 304kb の欠失を導入したコムギでは、農業形質を損なうことなくうどんこ病抵抗性を付与することに成功している (Nekrasov et al., 2017; Li et al., 2022)。今後は、ゲノム編集によりこれまで利用できなかった *S* 遺伝子を標的にした耐病性作物の作出が期待される。

3-2. ダイズにおける病害感受性遺伝子の研究と育種利用

機能欠失により複合病害抵抗性を付与する *S* 遺伝子の一つとして、*SSI2* が知られている。シロイヌナズナの *SSI2* (Suppressor of Salicylic Acid Insensitivity2) は、*NPR1* の機能喪失変異体 *npr1-5* の表現型を抑制するスクリーニングで単離された遺伝子であり、変異によってべと病や斑点細菌病に抵抗性となる劣性抵抗性遺伝子である (Kachroo et al., 2001; Shah et al., 2001)。ダイズの *SSI2* 遺伝子を *Bean pod mottle virus* (BPMV) を介したサイレンシングにより発現抑制すると、ダイズ茎疫病とダイズ斑点細菌病 (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*) に対する病徴が抑制される (Kachroo et al., 2008)。*SSI2* の機能喪失による複合病害抵抗性の獲得はイネ等の単子葉植物でも報告されている (Jiang et al., 2009) が、いずれの場合も自発的細胞死や生育抑制を伴う。

Wang らは、ダイズ EMS 変異体集団から自発的細胞死を起こす変異体をスクリーニングし、*GmLMM1* (*Glycine max lesion mimic mutant 1*) を単離した。*GmLMM1* はマレクチン様受容体キナーゼをコードしており、*Gmlmm1-1* 変異体は、ダイズ茎疫病およびダイズ斑点細菌病に対して抵抗性を示した。*GmLMM1* はベンサミアーナタバコ葉において *flg22* で誘導される抵抗反応を抑制すること、*FLS2* や *BAK1* と相互作用することから、パターン認識受容体 (PRR: Pattern Recognition Receptor) の機能を抑制する抵抗性の負の制御因子であると考えられた (Wang et

al., 2020)。その後、*GmLMM1* の変異はネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) に対する抵抗性も付与することが報告された (Zhang et al., 2022)。これは、ネコブセンチュウが生産する病原性因子 *MiRALF1* のターゲットである *GmLMM1* の機能が喪失したことによると考えられる。

上記二つの例は機能喪失により抵抗性を向上させるものの、いずれも生育不良を伴う。ダイズではこれまで、農業上利用可能な *S* 遺伝子の変異は報告例がなかったが、今年になって農業形質を損なうことなく抵抗性を付与する例が報告された。ダイズ茎疫病は多様なエフェクターを分泌し、宿主の抵抗性を抑制することで感染を成功させると考えられる。茎疫病菌が分泌する病原性エフェクターの一つである *PsAvh52* は、欠損により病原性が低下する一方、過剰発現させると茎疫病菌の増殖が助長されることから、主要な病原性因子の一つであり、*PsAvh52* はダイズのアセチル基転移酵素である *GmTAP1* を標的として感染を促進させると考えられた (Li et al., 2018)。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集でダイズの *GmTAP1* をノックアウトすると、3 種類の茎疫病菌株に対する抵抗性が増強される (Liu et al., 2023)。興味深いことに、*GmTAP1* をノックアウトしたダイズは野生型と同等の生育を示し、農業形質に影響しなかった。ダイズ茎疫病菌の病原性エフェクターに関する研究は数多くあることから、今後これらの標的を同定することで、有用な *S* 遺伝子および抵抗性アレルの開発が期待される。

おわりに

近年、ゲノム解析技術の向上により遺伝子情報をもとにしたマーカー選抜が可能となったことで、ダイズの抵抗性育種も飛躍的に進展してきている。ダイズで抵抗性遺伝子が単離された例は他の植物と比較してあまり多くない。これは、これまで遺伝子組換え等による機能証明が可能な品種が限られていたことが要因の一つである。近年、さまざまなダイズ品種で遺伝子導入やゲノム編集の成功例が報告されている。今後、抵抗性遺伝子の単離やゲノム編集による機能性の付与により、耐病性ダイズ研究の進展が期待される。

謝辞

本研究は、農研機構・姜 昌杰博士、田口文緒博士、南條洋平博士、菅野正治博士をはじめとする多くの共同研究者の方々のご協力のもとに実施されました。関係者の皆様に御礼申し上げます。また本研究の一部は、生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」(JPJ007097) の支援を受けて実施しました。

引用文献

- Ginny, A., Junhui, Z., Sheng, H., Ting, L., Bo, L., Frank, W., Bing, Y. (2010) Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *Plant Cell* 22: 3864–3876.
- Grau, C.R., Dorrance, A.E., Bond, J. and Russin, J.S. (2004) Fungal diseases. In R.M. Shibles, J.E.

- Harper, R.F. Wilson, and R.C. Shoemaker (Eds.), Soybeans: Improvement, production, and uses (Vol. 16, pp. 679–763). ASA, CSSA, and SSSA.
- Jiang, C.J., Hasegawa, M., Shimono, M., Sugano, S., Maeda, S., Inoue, H., Mori, M., Hasegawa, M., Sugano, S. and Takatsuji, H. (2009) Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene OsSSI2 enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 820–829.
- Jiang, C.J., Sugano, S., Kaga, A., Lee, S.S., Sugimoto, T., Takahashi, M. and Ishimoto, M. (2017) Evaluation of resistance to *Phytophthora sojae* in soybean mini core collections using an improved assay system. *Phytopathology* 107: 216–223.
- Jiang, C.J., Sugano, S., Ochi, S., Kaga, A. and Ishimoto, M. (2020) Evaluation of *Glycine max* and *Glycine soja* for Resistance to *Calonectria ilicicola*. *Agronomy* 10: 887.
- Kachroo, A., Fu, D., Havens, W., Navarre, D., Kachroo, P. and Ghabrial, S. (2008) An oleic acid-mediated pathway induces constitutive defense signaling and enhanced resistance to multiple pathogens in soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 564–575.
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J. and Klessig, D.F. (2001) A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9448–9453.
- Kusch, S. and Panstruga, R. (2017) *mlo*-based resistance: An apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease. *Mol Plant Microbe Interact* 30: 179–189.
- Li, S., Lin, D., Zhang, Y., Deng, M., Chen, Y., Lv, B., Li, B., Lei, Y., Wang, Y., Zhao, L., Liang, Y., Liu, J., Chen, K., Liu, Z., Xiao, J., Qiu, J.-L. and Gao, C. (2022) Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature* 602: 455–460.
- Li, H., Wang, H., Jing, M., Zhu, J., Guo, B., Wang, Y., Lin, Y., Chen, H., Kong, L., Ma, Z., Wang, Y., Ye, W., Dong, S., Tyler, B. and Wang Y. (2018) A *Phytophthora* effector recruits a host cytoplasmic transacetylase into nuclear speckles to enhance plant susceptibility. *eLife* 7:e40039.
- Lin, F., Chhapekar, S.S., Vieira, C.C., Da Silva, M.P., Rojas, A., Lee, D., Liu, N., Pardo, E.M., Lee, Y.C., Dong, Z., Pinheiro, J.B., Ploper, L.D., Rupe, J., Chen, P., Wang, D. and Nguyen, H.T. (2022) Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. *Theor Appl Genet* 135: 3773–3872.
- Liu, T., Ji, J., Cheng, Y., Zhang, S., Wang, Z., Dua, n K. and Wang Y. (2023) CRISPR/Cas9-mediated editing of *GmTAP1* confers enhanced resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *J Integr Plant Biol.* <https://doi.org/10.1111/jipb.13476>.
- Matsuoka, J-I., Takahashi, M., Yamada, T., Kono, Y., Yamada, N., Takahashi, K., Moriwaki, J. and Akamatsu, H. (2021) Identification of three closely linked loci conferring broad-spectrum *Phytophthora sojae* resistance in soybean variety Tosan-231. *Theor Appl Genet* 134: 2151–2165.
- 森脇丈治 (2010) 日本産ダイズ茎疫病菌のレース判別体系の構築を目指して. *植物防疫* 64:508–510.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D. and Kamoun, S. (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7: 482.

- 西 和文 (2008) ダイズ立枯性病害の発生実態と発生助長要因. 第 225 回日本作物学会講演会. 日本作物学会講演会要旨集 p.346.
- Sanfaçon, H. (2015) Plant translation factors and virus resistance. *Viruses* 7: 3392–3419.
- Schmitthenner, A.F. and Dorrance, A.E. (2015) *Phytophthora* root and stem rot. Compendium of soybean disease and pests, fifth edition (ed. by Hartman, G.L., Roupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L.), 73–76, APS press, St Paul, Minnesota.
- Shah, J., Kachroo, P., Nandi, A. and Klessig, D.F. (2001) A recessive mutation in the Arabidopsis SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens. *Plant J* 25: 563–574.
- 杉本琢真・大木信彦・小松邦彦・菅野正治・姜 昌杰・石本政男・羽鹿牧太 (2013) 室内接種試験を用いたダイズ茎疫病ほ場抵抗性の遺伝解析. 日本植物病理学会報 79(3): 258.
- Sugimoto, T., Yoshida, S., Aino, M., Watanabe, K., Shiwaku, K. and Sugimoto, M. (2006) Race distribution of *Phytophthora sojae* on soybean in Hyogo, Japan. *J Gen Plant Pathol* 72: 92–97.
- Sugimoto, T., Yoshida, S., Kaga, A., Hajika, M., Watanabe, K., Aino, M., Tatsuda, K., Yamamoto, R., Matoh, T., Walker, D. R., Biggs, A. R. and Ishimoto, M. (2011) Genetic analysis and identification of DNA markers linked to a novel *Phytophthora sojae* resistance gene in the Japanese soybean cultivar Waseshiroge. *Euphytica* 182: 133–145.
- 高橋真実・松岡淳一・山田哲也・河野雄飛・山田直弘・高橋浩司・森脇丈治・赤松創 (2019) 接種試験から推定される日本産ダイズ系統・品種のダイズ茎疫病抵抗性の特性. 北陸病虫研報 68: 45-50.
- 土屋貞夫 (1982) *Phytophthora megasperma* var. *sojae* Hildebrand によるダイズ茎疫病. 北海道立農試集報 48: 46–55.
- 土屋貞夫・田中文夫・足立大山 (1990) 日本産品種によるダイズ茎疫病菌のレースの類別と抵抗性品種の探索. 日本植物病理学会報 56(1): 144.
- 山下陽子 (2008) 北海道におけるダイズ茎疫病抵抗性研究. 植物防疫 62: 457–460.
- Wang, D., Liang, X., Bao, Y., Yang, S., Zhang, X., Yu, H., Zhang, Q., Xu, G., Feng, X. and Dou, D. (2020) A malectin-like receptor kinase regulates cell death and pattern-triggered immunity in soybean. *EMBO Reports* 21: e50442.
- Zhang, Q., Chen, S., Bao, Y., Wang, D., Wang, W., Chen, R., Li, Y., Xu, G., Feng, X., Liang, X. and Dou, D. (2022) Functional Diversification analysis of soybean malectin/malectin-like domain-containing receptor-like kinases in immunity by transient expression assays. *Front Plant Sci*, 23.

イネ-いもち病菌 GxGome の展望

寺内良平 ^{*,**}

Terauchi, R.

Towards understanding GxGome of rice and blast fungus.

Abstract

Since the proposal of gene-for-gene hypothesis by H. H. Flor, genetic analysis has revealed a large number of plant host *R*-gene/pathogen *AVR*-gene interactions. To generate blast resistant rice cultivars, we are studying rice (*Oryza sativa*)-blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) interactions using genetics and genomics approaches. In this presentation, I provide an overview of our current understanding of rice NLRs and *Magnaporthe* AVRs and share a prospect of GxGome of host-pathogen interactions using whole genome information.

Key words: Gene-for-Gene hypothesis, rice, blast, *Oryza sativa*, *Magnaporthe oryzae*, co-evolution

* 京都大学農学研究科応用生物科学専攻栽培植物起原学分野 Crop Evolution Laboratory, Graduate school of Agriculture, Kyoto University.

** (公財) 岩手生物工学研究センター Iwate Biotechnology Research Center (IBRC)

1. はじめに

フロー (H. H. Flor) は、1940 年代に、油料繊維作物のアマ (*Linum usitatissimum*) とその病原菌アマさび病菌 (*Melampsora lini*) の遺伝学的解析を通じて、遺伝子対遺伝子 (Gene-for-Gene) 仮説を提唱した (Flor, 1956, 1971). あるアマ

系統は、さび病菌の特定のレース (race) に抵抗性を示し、別のレースには感受性を示す。一方、あるさび病菌のレースは、特定のアマ系統には抵抗性を引き起こして感染できないが、別の系統には感染する。フローは、両生物の遺伝学的解析から、アマが優性の抵抗性遺伝子 (*R*-gene) を保有し、さび病菌が優性の非病原力遺伝子 (avirulence gene: AVR-gene) を保有すること、そして特定の *R*-gene と特定の AVR-gene が適合した時に抵抗性反応が誘導されると仮定すると観察結果を説明できることを示し、「遺伝子対遺伝子仮説 (Gene-for-Gene hypothesis)」を提唱した (図 1)。「遺伝子対遺伝子」の関係は、多くの植物と病原生物の間で確認される。発表者らは、ゲノム情報を活用して、イネといもち病菌の相互作用の遺伝学的解析を進めてきた。本発表では、イネといもち病菌の遺伝子対遺伝子相互作用の解析結果を報告するとともに、ゲノム情報を駆使した植物-病原菌の遺伝子対遺伝子相互作用の全貌解析 (仮称: GxGome) の展望について紹介する。

		植物抵抗性 (<i>R</i> -) 遺伝子の遺伝子型	
		<i>R/R</i> <i>R/r</i>	<i>r/r</i>
病原菌の AVR 遺伝子の遺伝子型	<i>AVR</i>	非親和性 (抵抗性)	親和性 (感受性)
	<i>avr</i>	親和性 (感受性)	親和性 (感受性)

図 1. 植物抵抗性遺伝子 (*R*-gene) と病原菌非病原力遺伝子 (AVR-gene) の間の遺伝子対遺伝子関係。顕性 (dominant) の抵抗性遺伝子と顕性の非病原力遺伝子がであった時にのみ非親和性 (植物は抵抗性、病原菌は非感染性) 反応が引き起こされる。植物は二倍体、病原菌は一倍体と仮定する。

2. イネ-いもち病菌相互作用の解析

イネは、世界人口の 50% 以上を支える主食である。糸状菌いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* によるイネいもち病は、世界作物の 7 大脅威の一つに挙げられており (Pennisi, 2008), その防除は世界の食糧安全にとって重要な課題である。植物病原菌は、多くのエフェクター分子を植物細胞内外に作用させ、植物の耐病性や代謝を操作することにより感染を成立させる (Hogenhout *et al.*, 2010)。一方、植物は、細胞表面の受容体により病原菌に保存されている分子パターンを認識して抵抗性を誘導すると共に、細胞内に注入されたエフェクター

を抵抗性遺伝子(Resistance gene: *R*-gene)産物により認識して,しばしば過敏感細胞死(Hypersensitive Response: HR)を伴う強い抵抗性を発揮する.抵抗性遺伝子は多くの場合,Nucleotide-binding Leucine-rich repeat(NLR)型の細胞内受容体をコードしている.植物NLRに認識される病原菌エフェクターを非病原力(Avirulence:AVR)エフェクターと呼ぶ.

発表者の研究グループは,イネのいもち病抵抗性増強を目的として,いもち病菌AVRエフェクターとイネのNLR型抵抗性タンパク質の相互作用に注目した研究を続けてきた.ゲノム情報と連関解析により,いもち病菌のAVRエフェクター3種類,AVR-Pia, AVR-Pik, AVR-Piiを単離した(Yoshida, Saitoh *et al.*, 2009: 図2).これらのAVRエフェクターを認識するイネ抵抗性遺伝子の内,*Pik*は既報(Ashikawa *et al.*, 2008)であったが,*Pia*, *Pii*を独自に単離した(Okuyama *et al.*, 2011; Takagi *et al.*, 2013).イネ*Pia*, *Pik*, *Pii*は,全て密接に連鎖した2つのNLR遺伝子(ヘルパーNLRとセンサーNLR)から構成されるNLRペア(Paired NLR)である(図2).センサーNLRには,典型的なドメイン構造に加えて,挿入ドメイン(Integrated Domain: ID)が付加されている.*Pia*と*Pik*のセンサーNLRには,Heavy Metal Associated(HMA)ドメイン,*Pii*のセンサーNLRには,Nitrate Induced(NOI)ドメインが付加している.AVR-PiaとAVR-Pikは直接HMA-IDに結合して認識されること(Maqbool, Saitoh *et al.*, 2015),AVR-PiiはいネのExo70タンパク質を介してPii-2のNOI-IDにより認識されること(Fujisaki *et al.*, 2015)などが明らかになった.IDは,宿主植物のエフェクター標的因子の断片がNLRに取り込まれ,エフェクター認識に利用されるように進化したと考えられる(Bailey *et al.*, 2018).いもち病菌AVR-Pik遺伝子とイネ*Pik*遺伝子には,多数の対立遺伝子が知られており,それらの間で

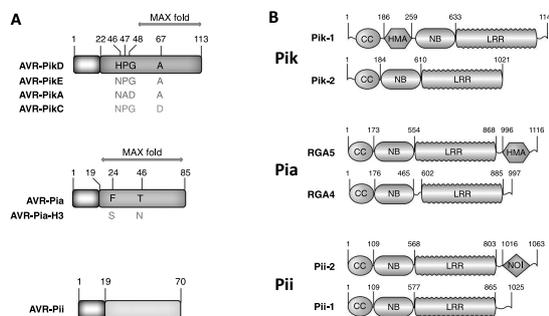


図2. いもち病菌AVRとそれらを認識するイネ抵抗性タンパク質の模式図.
A: いもち病菌AVR-Pikの4種類のアリル産物(AVR-PikD, E, A, C)とそれらのアミノ酸多型(上), AVR-Pia(中), AVR-Pii(下). N-末の灰色領域はシグナルペプチド. **B:** *Pik*を構成するPaired NLR, *Pik*-1と*Pik*-2(上), *Pia*を構成するRGA5とRGA4(中), *Pii*を構成するPii-2, Pii-1(下).

認識特異性がある。AVR-Pik と Pik-1 センサー-NLR の HMA ドメインにはアミノ酸置換が蓄積しており、これら 2 者の中に、結合と結合回避の方向の強い自然選択が働き、これらの分子が共進化している可能性が示唆された (Kanzaki *et al.*, 2012) . *Pik* 抵抗性遺伝子を持たないイネにおいて、AVR-Pik は、イネの small HMA (sHMA) タンパク質に結合して ROS を負に制御して病原性に寄与していると考えられる (Oikawa *et al.*, 2020) . 進化の過程で、sHMA の断片が NLR に挿入されて、病原菌エフェクター-AVR-Pik のベイトとして機能するようになったのであろう (図 3 ; Oikawa *et al.*, 2020) .

最近には、イネ *Pia* 遺伝子座の対立遺伝子 *Pias* とそれが認識するいもち病菌非病原力因子 *AVR-Pias* の単離同定にも成功した (Shimizu *et al.*, 2022) . *Pias/Pia* 遺伝子座のセンサー-NLR の ID は多様であり、進化過程で多くの断片が挿入され、多様な病原菌エフェクターを認識する機能を獲得したと推察される。このセンサー-NLR 遺伝子の DNA 変異を解析したところ、balancing selection の痕跡と trans-species

polymorphism が観察された。この結果は、*Pias/Pia* のセンサー-NLR 遺伝子が、超優性選択または頻度依存選択を受けていることを示唆する。また、イネの組換え近交系統群 (Recombinant Inbred Lines: RILs) といもち病菌の交配系統群を利用して、*Pik* の新規対立遺伝子 *Piks* とそれが認識するいもち病菌非病原力エフェクター (AVR-Mgk1) の単離同定にも成功した (Sugihara *et al.*, 2023) .

3. 植物-病原菌 GxGome に向けて

フローは、植物と病原菌の両者について遺伝学的解析を実施して、遺伝子対遺伝子説を提唱した。ゲノム情報が容易に得られるようになった現在、フローの遺伝子対遺伝子の関係を、宿主と病原菌の遺伝子間相互作用全体に適用して、GxGome (Gene by Gene-ome) を提唱することができる (図 4) . 遺伝的に異なる宿主植物 2 系統を交配して、F2 を起点として RILs を育成する。F6 世代程度で各系統はほぼ純系となるので、全ゲノムシーケンスなどにより各 RIL 系統の遺伝子型を決定する。一方、病原菌も異なる菌株の交配により F1 系統群を作出する。半

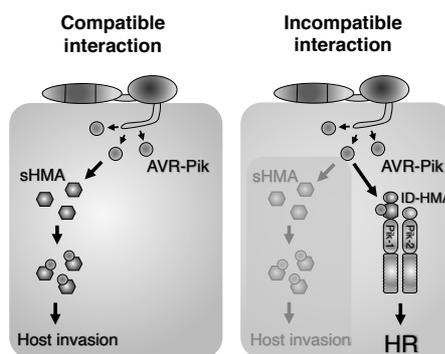


図3. いもち病菌AVR-PikエフェクターとイネsHMAタンパク質およびPik抵抗性タンパク質相互作用の模式図。左:親和性相互作用; AVR-Pikは、イネsHMAに結合し、イネへの感染を促進する。右:非親和性相互作用; AVR-Pikは、PikのHMA-IDに結合して認識され、過敏感細胞死(HR)を伴う抵抗性反応を誘導する。

数世代が卓越する病原菌では、F1 において両親のゲノムの組換え体を得られる。これらの植物 RILs と病原菌 F1 を、総当たりで接種試験に供し、反応を観察する。特定の病原菌 F1 個体に対して、複数の植物 RILs 系統が抵抗性/感受性の分離を示す場合には、この表現型と RILs の遺伝子型の連関解析により、抵抗性遺伝子単離が可能である。一方、特定の宿主 RIL 個体に対して、複数の病原菌 F1 系統を接種した時に、抵抗性/感受性の分離を示す場合には、この表現型と病原菌 F1 の遺伝子型の連関解析により、AVR 遺伝子単離が可能である。さらに、宿主と病原菌の関係が親和性の場合に注目すると、高罹病性(高病原性)と弱罹病性(弱病原性)の分離を観察し、それぞれの種において連関解析を実施することにより、エフェクター因子(宿主)とエフェクター因子(病原菌)を同定することが可能となる。

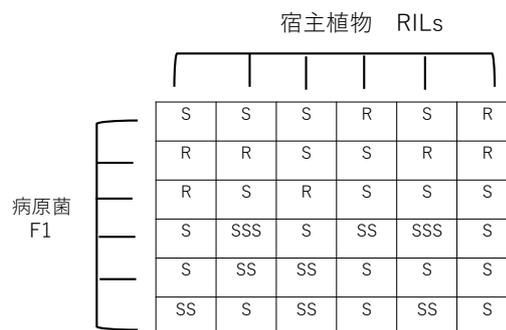


図4. GxGomeの模式図. 宿主植物の組換え近交系(RILs)と病原菌のF1をもちいて、総当たりで接種試験をおこない、抵抗性(R)、感受性(S)、高度感受性(SS, SSS)などの表現型を観察する。上3行の例では、RとSが分離する。宿主の遺伝子型と表現型の連関解析により、抵抗性遺伝子の同定が可能である。下3行の例では、SとSS,SSSなどが分離し、罹病性遺伝子(S-gene)の同定が可能である。同様に、列に注目すると、病原菌のAVR遺伝子を同定することができる。病原菌は一倍体世代が卓越すると仮定する。

宿主と病原菌の Red Queen 共進化の過程 (vanValen, 1973) において、性と組換えを有する生物系統の個体が、進化する病原菌を回避し生き残ることができるとの考えが提唱された (Hamilton *et al.*, 1990). 線虫を用いた実験からこの仮説を支持する結果が得られている (Morgan *et al.*, 2011).

宿主と病原菌の間の共進化には、主に Matching Allele (MA) モデルと Gene for Gene (GFG) モデルが提唱されている (Nuismer, 2017; Schmid-Hempel, 2021). 動物と病原菌の相互作用は MA モデルにもとづいて研究される場合が多い。一方、植物においては、抵抗性遺伝子と非病原力遺伝子の相互作用に注目して GFG モデルによる共進化解明が進められている。今後、上記 GxGome 手法により、MA モデルに従う植物-病原菌共進化の解明も進展するものと考えられる。

謝辞

本発表内容は、(公財)岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部、京都大学農学研究科栽培植物起原学分野の多くの研究員、学生との共同研究の成果である。研究の一部は、日本学術振興会科学研究費 15H05779, 20H05681 の支援で実施された。

引用文献

- Ashikawa I, Hayashi N, *et al.* (2008) Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance. *Genetics*, 180:2267-2276.
- Bailey PC, Shudoma C, *et al.* (2018) Dominant integration locus drives continuous diversification of plant immune receptors with exogenous domain fusions. *Genome Biology* 19 :23.
- Flor, H., H., (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics* 8:29-54.
- Flor, H., H., (1971) "*Current status of the gene-for-gene concept*". *Annu Rev Phytopathol.* 9: 275–296.
- Fujisaki K, Abe Y, *et al.* (2015) Rice *exo70* interacts with a fungal effector, AVR-Pii, and is required for *AVR-Pii*-triggered immunity. *Plant J*, 83:875-887.
- Hamilton WD *et al.* (1990) Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *PNAS* 87:3566-73.
- Hogenhout, S.A., Van der Hoorn, *et al.* (2010) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms *MPMI* 22:115-122.
- Kanzaki H, Yoshida K, *et al.* (2012) Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* *AVR-Pik* and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. *Plant J*, 72:894-907.
- Maqbool A, Saitoh H, *et al.* (2015) Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *eLife*, 4:e08709.
- Morgan *et al.* (2011) Running with the Red Queen: Host-parasite coevolution selects for biparental sex. *Science* 33:534-537.
- Nuismer, S. N. (2017) *Introduction to Coevolutionary Theory*. W. H. Freeman.
- Oikawa K, Fujisaki K, *et al.* (2020) The blast pathogen effector AVR-Pik binds and stabilizes rice heavy metal-associated (HMA) proteins to co-opt their function in immunity. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.406389>
- Okuyama Y, Kanzaki H, *et al.* (2011) A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant J*, 66:467-479.
- Pennisi, E. (2008) Armed and dangerous. *Science*, 327:804-5.
- Schmid-Hempel (2021) *Evolutionary Parasitology*, 2nd Edition, Oxford.

- Shimizu M, Hirabuchi A, *et al.* (2022) A genetically linked pair of NLR immune receptors shows contrasting patterns of evolution. *PNAS* 119(27) e2116896119
- Sugihara, Y., *et al.* (2023) Disentangling the complex gene interaction networks between rice and the blast fungus identifies a new pathogen effector. *PLoS Biology* 21:e3001945.
- Takagi H, Uemura A, *et al.* (2013) MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. *New Phytol*, 200:276-283.
- vanValen L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30.
- Yoshida K, Saitoh H, *et al.* (2009) Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell*, 21:1573-1591.

植物病原糸状菌の二次代謝産物生合成に依存した寄生戦略の進化

児玉 基一郎*・赤木 靖典*・高尾 和実*・江草 真由美*・有江 力**・柘植 尚志***

Kodama, M.* , Akagi, Y.* , Takao, K.* , Egusa, M.* , Arie, T.** and Tsuge, T.***

Evolution of parasitic strategies dependent on secondary metabolite biosynthesis in plant pathogenic fungi

Abstract

Fungal strategies for successful infection of host plants are highly diverse among fungal pathogens, ranging from biotrophs to necrotrophs. The increasing number of sequenced microbial genomes has led to the identification of fungal genes involved in pathogenesis, for example genes for the biosynthesis of toxic secondary metabolites such as host-specific (selective) toxins (HSTs). The availability of fungal genome sequences has also revealed a remarkably large number of biosynthetic gene clusters for natural products. Among these secondary metabolites, polyketides and nonribosomal peptides, including cyclic peptides, are extremely large classes of natural products of fungal origin. The tomato pathotype of *Alternaria alternata* (*A. arborescens*), the causal agent of tomato stem canker, produces host-specific AAL-toxins (polyketides) and induces apoptotic cell death on tomato cells. We discuss the hypothesis that the ability to produce HSTs and to infect host plants is distributed among *A. alternata* strains by horizontal transfer of an entire pathogenicity chromosome (conditionally dispensable chromosome). This may provide a possible mechanism by which new toxin producers (plant pathogens) arise in nature. In addition, the ability to produce HST may have evolved in necrotrophic *Alternaria* pathogens as a pathogenic strategy to disrupt the nonhost resistance response in plants.

Key words: *Alternaria alternata*, AAL-toxin, host-specific toxin, gene cluster, horizontal gene (chromosome) transfer, necrotroph, plant pathogenic fungi, polyketide, secondary metabolite

*鳥取大学農学部 Faculty of Agriculture, Tottori University (Corresponding author: Kodama, M., mk@tottori-u.ac.jp)

**東京農工大学農学研究院 Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

***中部大学応用生物学部 Department of Biological Chemistry, Chubu University

1. はじめに

植物病原菌に由来する親和性誘導のキー化合物であり、現在では病原性エフェクターとして位置付けられている“宿主特異的毒素” (host-specific (selective) toxin, HST) の存在が世界で初めて報告されて以来、90年が経過した。その端緒となった報告は日本発で、鳥取高農から京都帝国大学に進んだ田中彰一によるナシ黒斑病菌 (*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype synonym *A. gaisen*, 当時の *A. kikuchiana*) 毒素 (後の AK 毒素) の発見である (Tanaka, 1933)。本論文は英語で発表されたものの掲載誌が大学紀要であったため、当時、世界的に周知の事実となるまでには至らなかった。

その後、1940年代後半になり米国において、エンバクビクトリア葉枯病菌 (*Cochliobolus victoriae*) より感受性品種に対してのみ毒性を発揮する毒素 (後のビクトリン, HV 毒素) が発見された (Meehan and Murphy, 1947)。ところで本毒素は、このように長い研究歴を有するが、生合成機構が明らかになったのはごく最近である (Kessler *et al.*, 2020)。さらに、1960年代に米国の Scheffer らは、モロコシミロ病菌 (*Periconia circinata*) が生産する毒素 (後の PC 毒素) の発見を契機として、このような高い宿主特異性を有する植物毒素を“host-specific toxin”と命名した (Pringle and Scheffer, 1964)。この時期に、後に本邦における HST 研究を牽引することになる西村正暘博士が Scheffer 研に留学中であったことから、上記の田中博士による毒素研究が紹介されるという僥倖が重なり、AK 毒素が世界初の HST 報告という評価を得ることとなった。この発見は、2000年を記念して米国植物病理学会 (APS) が公表した、当該分野における 20 世紀の 10 大発見の 1 つとして評価されるに至っている。Scheffer および西村らによる HST の定義、すなわち、“①宿主植物に対してのみ毒性を発揮 (特異的毒性)、②病原菌による毒素生産性と病原性が一致 (生産菌のみが発病性発現)、③植物の病害感受性と毒素感受性が一致 (特異的感受性)、および④孢子発芽時による毒素生産”は、現在まで HST の判断基準となっている。

HST は、微生物由来の化合物としては典型的な二次代謝産物の 1 つと言える。HST の定義は極めて明確であり、それを満たす二次代謝産物が病原菌における“真の”病原性決定因子であることは論を俟たない。病理学的視点からは、HST の合目的性には目を瞞るが、現在までに知られている HST は約 20 種である (Tsuge *et al.*, 2012)。病原性決定因子の 1 カテゴリーとして、この数が多いのか、それとも少ないのか、議論が分かれるところである。植物病原菌が宿主植物に対する寄生戦略の一環として、多彩な化学構造と生物活性を有する二次代謝産物を採用することは極めて妥当である。HST のような宿主細胞死を誘導するに導く毒素の生産は、necrotroph 型病原菌にとって決定的な感染手段である。他方、生活環の少なくとも一時期において生細胞との相互作用を必要とする biotroph, (hemi)biotroph 型の病原菌にとって、特異的な細胞死誘導因子は、逆に非親和性相互作用を導く特異的エリシター (抵抗性品種特異的毒素) とも言えよう (Wolpert *et al.*, 2002; Yoder and Turgeon, 1996)。そのため、全ての植物病原菌にとって HST は病原性因子とはなり得ない。さらにたとえ necrotroph 型病原菌であろうとも、HST は病原菌と宿主植物間における進化の僥倖が生み出した存在のように考えられる。

Alternaria 属菌のような“毒素依存 necrotroph 病原菌”においては、HST 生産能が菌の主要な発病戦略であるとしンプルにみなされる (Akimitsu *et al.*, 2014; 児玉, 2019; Kodama, 2019; Tsuge *et al.*, 2012)。そのため、HST 生合成の分子機構と多様性創出機構、また、宿主植物における感受性機構を明らかにすることが、植物病原菌、とりわけ necrotroph 病原糸状菌における寄生戦略進化の分子機構解明に通じると期待される。

2. 植物-病原菌相互作用における二次代謝産物の生物学的意義

植物、糸状菌および細菌等は、一般に種々の化学構造を備えた二次代謝産物 (secondary metabolite) 生産能を有する。その一部は生産者にとっての利益が明白であるが、コストをかけてまで生産する意義が見出されないケースも多い。そのため二次代謝産物の大部分は、単に有用化合物生産に付随する不用物、副産物であって、その構造の多様性は偶然の産物であるとの見方もあった。しかし現在では、その生物学的意義と構造の多様性は、適応の見地から説明がなされるとの考え方が一般的である。すなわち、植物-病原微生物相互作用の観点からは、植物由来の二次代謝産物は感染防御の手段として、一方、寄生菌由来のものは植物への攻撃手段として、その生合成系が適応進化してきたと考えられる。生物学的意義が明確である二次代謝産物では、植物由来の化合物においてアルカロイドやテルペノイドがメジャーな位置を占めるのに対し、菌由来の化合物の多くはポリケチド、あるいは環状ペプチドなど非リボソーム型ペプチド (リボソーム非依存的に生合成されるペプチド) であることは興味深い。

ただし、植物-病原微生物相互作用の場において明確な意義が認められる二次代謝産物は全体の一部に過ぎない。大部分の微生物由来二次代謝産物は、生産菌の生態的ニッチにおける他者との競合を有利に導き、自身の生存を助ける役割を有すると考えられている (Fox and Howlet, 2008)。大多数の微生物は主に腐生生活者であり、常に無数の競合微生物、捕食者に取り囲まれているため、自身の生存確率を高めるための生理活性物質 (主に毒素) を生産放出する能力を進化させる必要があったのであろう。土壌中での腐生生活のような場における二次代謝産物の意義を明確に示した例は多くはないが、後述するグローバルレギュレーター *LaeA* 変異 *Aspergillus nidulans* (全般的な二次代謝産物生産が著しく低下している) において、菌食性節足動物 (トビムシ, *Folsomia candida*) による捕食程度が増加する例が示されている (Rohlf et al., 2007)。また、エンドファイトでは、共生関係を確立している植物の適応度・生存率を向上させるため、害虫毒性を有する二次代謝産物を植物体内で生産し、害虫による摂食を防いでいるケースもある (Tanaka et al., 2012)。この場合、三者間相互作用 (植物、微生物および昆虫) の進化過程において、二次代謝産物が決定的な役割を果たしている。

3. 微生物における二次代謝産物生合成メカニズム

二次代謝産物生合成の最初のステップは、“バックボーン (backbone) 酵素” とよばれる以下の 5 種のタンパク質のうちひとつによって開始される。すなわち、非リボソーム型ペプチド合成酵素 [nonribosomal peptide synthase (NRPS)], ポリケチド合成酵素 [polyketide synthase (PKS)], hybrid NRPS-PKS 酵素, prenyltransferase (DMATS), terpene cyclase (TC) である。合成された中間産物は、その後、“修飾 (decorating) 酵素” あるいは“アクセサリー (accessory) 酵素” により変換・修飾され、ある場合では、さらにトランスポーターにより細胞外に排出されることもある (Fox and Howlett, 2008; Keller, 2011; Khaldi et al., 2010)。これら遺伝子はゲノム上で物理的に近接して、すなわちクラスター化して存在しており、クラスター特異的な Zn_2Cys_6 タイプ転写調節因子やグローバルレギュレーター *LaeA* により、協調的発現をすることが知られている (Fox and Howlett, 2008; Keller,

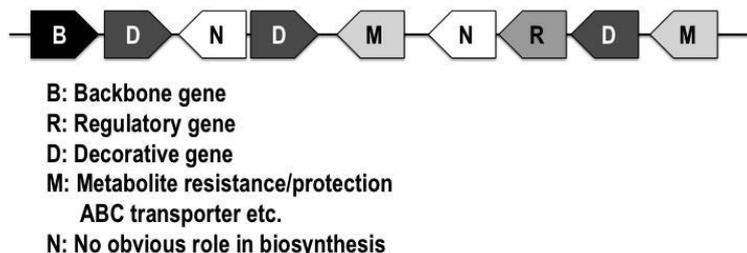


図1 二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの模式図

2011). クラスター上には、上記遺伝子に加え、産物に対する自己耐性を賦与する“抵抗性（耐性）（resistance）遺伝子”が座乗することもある（トランスポーターが兼ねる場合もある）。典型的な二次代謝産物生合成クラスターの構造を図1に示した。

病原性関連因子としての機能を有する二次代謝産物生合成に関わる遺伝子群は、宿主植物との相互作用の場において誘導的に発現するケースが一般的であるが、後述する HST 生合成遺伝子クラスターは、常時強力に発現している例も多い。宿主への侵入に先がけて胞子発芽時に生産されることが HST の条件のひとつとして挙げられているが、蒸留水中や人工基質上で胞子発芽させた時でも生合成される HST は多い。しかも生産菌はトータルな代謝の相当な部分を HST 生合成に振り分けており、宿主植物の存在がなければ、むしろ他者との競合力は低下していると言わざるを得ない。

4. 病原糸状菌エフェクターとしての二次代謝産物/HST

多くの HST は、糸状菌の二次代謝産物として代表的なポリケチドおよび非リボソーム型ペプチド（環状ペプチド）様構造を有している。多彩な化学構造と生物活性を有する二次代謝産物を、病原糸状菌が宿主植物に対する寄生戦略の一環として採用することは、極めて妥当である。以下、非リボソーム型ペプチドである AM 毒素〔リンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype, synonym *A. mali*) 由来〕およびポリケチドである AAL 毒素〔トマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. alternata* tomato pathotype, synonym *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, synonym *A. arborescens*, 茎枯病菌) 由来〕に関して、生合成機構を紹介する。

非リボソーム型ペプチドとポリケチドは、それぞれ非リボソーム型ペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthetase, NRPS）およびポリケチド合成酵素（polyketide synthetase, PKS）と呼ばれる巨大多機能酵素によって生合成される（Cane and Walsh 1999）。また、NRPS のうち、特に環状ペプチドの生合成に関与する酵素は環状ペプチド合成酵素（cyclic peptide synthase, CPS）と呼称される（Konz and Marahiel 1999）。NRPS および PKS は、それぞれ基本ブロックとなる個々のアシル CoA あるいはアミノ酸類を順次連結、伸長させることにより、最終的に目的産物を作り上げる。ポリケチドと非リボソーム型ペプチドの化学構造は全く異なっているが、その生合成系には類似点が多いことが指摘されている（Cane and Walsh 1999）。両化合物は、ともに分子内に複数の機能ユニット（モジュールあるいはドメインと呼ばれる）を有する極めて巨大な多機能酵素（200～2,000 kDa）により生合成が進行する。

AM 毒素生合成を支配する CPS 遺伝子 *AMT(1)* は、本邦としては HST 生合成遺伝子クローニングの初の例となった（Johnson *et al.*, 2000b）。なお、世界で初めて単離された HST 生合成遺伝子は、トウモロコシ北方斑点病菌 *Cochliobolus carbonum* race 1 に由来する、環状ペプチド毒素である HC 毒素の生合成 CPS 遺伝子である（Scott-Craig *et al.*, 1992）。ちなみに、最初の植物病害抵抗性遺伝子のクローニング例もまた、本菌と宿主トウモロコシの解析から明らかとなった毒素抵抗性遺伝子 *HMI* である（Johal and Briggs, 1992）。現在ならば、糸状菌における二次代謝産物生合成遺伝子の同定は、①ゲノムドラフト解析→②アノテーション→③候補遺伝子のターゲットィング（ノックアウト）による機能解析と比較的容易に進行するが、20 年以上以前の段階では困難を極めた。それは、保存配列よりデザインされた CPS 遺伝子単離のためのユニバーサルプライマーを用いた PCR 法と、毒素生産菌ゲノムライブラリーのスクリーニングにより達成された（Johnson *et al.*, 2000b）。*AMT* は、13.1 kb の ORF を持ち、イントロンは存在しない。次世代シーケンサーはもとより、キャピラリーシーケンサーの普及以前の時代のため、平均的な遺伝子サイズの数倍の、このような長大な遺伝子では、自前のシーケンス解析だけでも数ヶ月

を要した。本遺伝子には、AM 毒素を構成する 4 個のアミノ酸および有機酸にそれぞれ対応するアミノ酸活性化ドメインが認められた。AMT ターゲティングの結果より、“毒素生合成遺伝子 = 病原性 (力) 遺伝子” であることが証明された (Johnson *et al.*, 2000b)。同様に環状ペプチド様構造を有するピクトリンは、発見後半世紀以上経過して、最近生合成遺伝子が解明されたが、予想に反してリボソーム型ペプチドであった (Kessler *et al.*, 2020)。

興味深いことに、AM 毒素生合成に関与する 2 番目の遺伝子 (AMT2) がクローニングされ、イチゴ黒斑病菌の AFT クラスタに含まれる AFTSI 遺伝子と相同性を示すことが明らかとなった (Ito *et al.*, 2004)。AF 毒素はナシ黒斑病菌の AK 毒素同様、デカトリエン酸を基本構造としており両毒素の化学構造は全く異なるが、分子内に類似コンポーネントを有している。この事実は、それぞれの病原菌が同一機能遺伝子を進化過程でシェアし、宿主識別に利用していることを示唆するものであり、病原菌の合理的な一面を窺わせる大きな発見である。

茎枯病菌 (*A. arborescens*) は、ポリケチド化合物である宿主特異的 AAL 毒素を生産し、ファースト系などの特定のトマト品種に病気を引き起こす (Akamatsu *et al.*, 1997; Gilchrist and Grogan, 1976)。本毒素は、*Fusarium* 属病原菌が生産するマイコトキシンのフモニシンに化学構造および生物活性が類似している (児玉ら, 2015; Yamagishi *et al.*, 2006a) (図 3)。フモニシンの生合成に関わる FUM クラスタは、PKS, トランスポーター, 転写因子および複数の修飾酵素からなり、少なくとも 10 遺伝子がフモニシン生合成に関与している (Proctor *et al.*, 2003, 2006)。

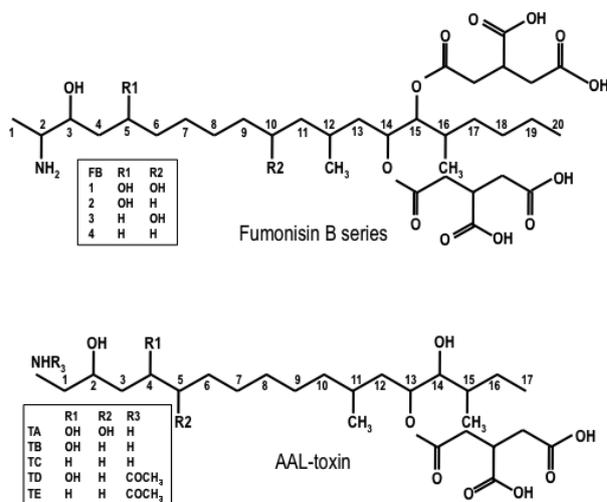


図 3 AAL 毒素とフモニシンの化学構造

一方、AAL 毒素生合成遺伝子 (ALT) クラスタは茎枯病菌のみに存在し、ポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子 (ALT1), ABC トランスポーター, LAG 蛋白質, P450 等をコードする少なくとも 13 遺伝子群から構成されている (Akagi *et al.*, 2009a,b; Kodama, 2019; Tsuge *et al.*, 2012)。遺伝子ターゲティングの結果より、クラスタ遺伝子は、毒素生合成と同時に病原性発現に直

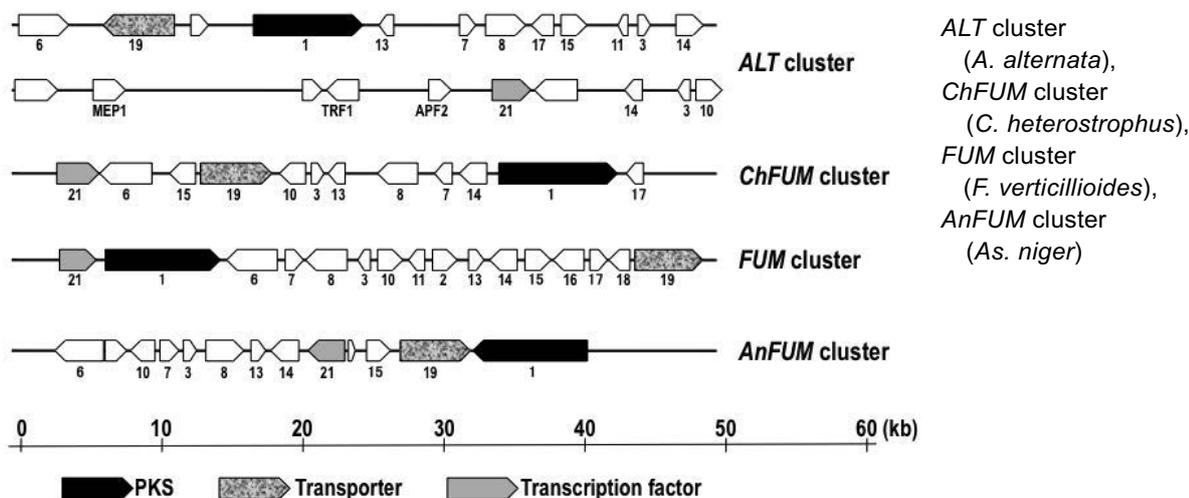


図 4 FUM クラスタホモログの比較

接関与しており、前述の AM 毒素のケースと同様、*ALT* クラスタは病原性遺伝子クラスタとして機能している (Akagi *et al.*, 2009a,b; Kodama, 2019; Takao *et al.*, 2016a, b). *ALT* クラスタに含まれる遺伝子群は *FUM* クラスタ中の遺伝子と相同性を示すが、個々の遺伝子の配列順序、転写方向は異なっている (図 4).

また、クラスタ遺伝子の発現は、広範かつ強力な転写制御因子であるグローバルレギュレーター *LaeA* によってコントロールされている (Takao *et al.*, 2016a). さらに、G 蛋白質シグナル伝達経路も、*Alternaria* における HST 生産と病原性発現に関与している (Takao *et al.*, 2016b; Yamagishi *et al.*, 2006b). なお、*ALT* クラスタ上において、予期せず酵母 *LAG1* オーソログが見出された. 本遺伝子は、酵母における寿命を左右する遺伝子として最初に単離された (D'mello *et al.*, 1994). その後トマトの茎枯病抵抗性遺伝子、すなわち AAL 毒素耐性遺伝子 *Asc1* が LAG 蛋白質をコードしていることが明らかとなった (Brandwagt *et al.*, 2000). 本毒素は感受性トマトのセラミド合成系を阻害し、さらにアポトーシスを誘起することにより毒性を示す. 抵抗性トマト品種および非宿主植物では、阻害されたセラミド合成系のサルベージ経路として *Asc1* が機能するため、病害抵抗性/毒素耐性となる (Mullen *et al.*, 2011; Spassieva *et al.*, 2002). 一方、トマト感受性品種では、本遺伝子に変異が入り機能しない (Brandwagt *et al.*, 2000). 現在では、これら *LAG1* ホモログは *LASS/Lag* ファミリーに属するセラミド合成酵素遺伝子として認識されている (Mellen *et al.*, 2011; Spassieva *et al.*, 2002). また、*Asc1/Lag1* ホモログは *Arabidopsis thaliana* や寄生植物 *Orobancha cumana* においても見出され、同様に AAL 毒素感受性/抵抗性を支配している (Gechev *et al.*, 2008; de Zelicourt *et al.*, 2009). 本毒素によるセラミド合成系の阻害は非特異的作用であり、その生産菌が毒素生合成遺伝子クラスタ内に、植物が保有する耐性遺伝子オーソログを備えていることは何を意味するのか? その理由を検討するため茎枯病菌において遺伝子欠損株を作出したが、毒素耐性等に変化は認められなかった (Kheder *et al.*, 2012). しかし、ゲノム解析の結果から、茎枯病菌は他に少なくとも 2 コピーのセラミド合成酵素遺伝子を保有していることが明らかとなり、これら遺伝子の関与も同時に検討する必要がある.

また、ゲノム解析の結果、Sordariomycetes に属する *Fusarium* 種、Eurotiomycetes に属する *Aspergillus niger* および Dothideomycetes に属する *C. heterostrophus* および *A. alternata* tomato pathotype の 4 種が *FUM* クラスタホモログを保存していることが示された. 一方、*As. niger* を除く *Aspergillus* 属菌や、茎枯病菌を除く他の *Alternaria* では *FUM* ホモログは見出されていない. 以上の事実は、*FUM* クラスタの獲得・拡散過程に、菌株間における水平移動が関与した可能性を強く示唆する (Akagi *et al.*, 2009a; Khaldi and Wolfe, 2011; Kodama, 2019).

一方、他の necrotroph 菌であるトマト褐色輪紋病菌 (*Corynespora cassiicola*) が、*C. heterostrophus* race T の T-toxin 生合成遺伝子クラスタをフルセットで保有しているとともに、病原性因子として機能していることが示された (Condon *et al.*, 2018). この場合も、遺伝子クラスタ水平移動が病原性の進化に関与していることが示唆されている.

5. 二次代謝産物 (HST) 生合成系に依存した病原性進化と多様性形成

茎枯病菌の *ALT* クラスタは、本菌が特異的に保有する 1.0 Mb の小型染色体に座乗していた (Akamatsu *et al.*, 1999; Akagi *et al.*, 2009a). この小型染色体は、*A. alternata* が共通して保有する essential 染色体 (EC) と塩基配列レベルの相同性が低い. 本染色体を人為的に欠損させた場合、毒素生合成能に加え病原性も失活するが、菌成長などには影響が皆無であることから、1.0 Mb 染色体は conditionally dispensable 染色体 (CDC) であると考えられた (Akagi *et al.*, 2009a,b; Akamatsu *et al.*, 1999; Covert *et al.* 1998; Johnson *et al.*, 2000a; Salamiah *et al.*, 2001a,b).

世界各地で採集された茎枯病菌分離菌株を用い、それぞれの菌株が保有する CDC および EC の起源・系統関係について、染色体間／菌株間の分子系統解析や CDC シーケンス解析などを通して検討した。その結果、EC は菌株間で多様性を示したが、CDC はすべての菌株で同一であると考えられ、CDC の由来が他のゲノム領域と異なる可能性が示唆された (Akagi *et al.*, 2009a)。このことから、CDC は EC とは独立して、水平移動を通して *A. alternata* 集団中に伝播した可能性が考えられた (Akagi *et al.*, 2009a)。仮に、*A. alternata* 間で CDC の水平移動が生じてしているのであれば、異なった遺伝的バックグラウンドを持つ *A. alternata* 菌株において、茎枯病菌の CDC が安定して維持されるはずである。そこで、細胞融合法により茎枯病菌とイチゴ病原型菌 (イチゴ黒斑病菌) 間において融合株を作出した (Akagi *et al.*, 2009b; Salamiah *et al.*, 2001a,b)。得られたハイブリッド株は、両親株の CDC を同時に保持しているか、茎枯病菌由来の CDC のみを保持していた。融合株の染色体構成を検討したところ、各菌株はランダムに両親株の染色体を保持していることが示唆された (Akagi *et al.*, 2009b)。また、イチゴ黒斑病菌のバックグラウンドに茎枯病菌由来の CDC のみが導入されたと推定される株も得られ、本 CDC が異なる遺伝的バックグラウンドを有する *A. alternata* ゲノム中において安定して移行、維持される可能性が示された (Akagi *et al.*, 2009b)。

これら一連の研究結果を踏まえ、HST 依存植物病原菌における病原性の進化と多様性形成過程に、*Tox* クラスター、さらには CDC の水平移動 (伝播) が関与しているとの作業仮説 (染色体水平移動説) を提唱した (Akagi *et al.*, 2009a,b; Kodama, 2019; 児玉, 2019)。CDC は宿主特異的毒素生産菌における“病原性染色体”と呼ぶにふさわしい。また、約 100 kb にわたるクラスター上の毒素生合成関連遺伝子の全セットを非病原性 *A. alternata* 株に導入したところ、AAL 毒素生合成能/病原性を賦与することに成功した (高尾ら, 2013)。すなわち、AAL 毒素生合成に必要な酵素反応の全てを、*ALT* クラスター遺伝子のみでカバーすることが可能であると推測された。これらの結果は、*ALT* クラスター／CDC の水平移動により、AAL 毒素生産能および病原性という形質が *A. alternata* によって獲得され、集団中に拡散した可能性をさらに支持する。

病原性染色体/CDC の起源を解明するため、特にトマトの起源地である南米地域を中心として、世界各地で分離した *Alternaria* 菌株のゲノム解析を進めた。従来、非病原性 *Alternaria* において CDC は見出されていなかったが、PFGE 解析等を通して、世界各地で分離した非病原性 *Alternaria* 株のうち一部の菌株が、小型染色体を保有することが示された。さらに、ペルー由来の小型染色体保有菌株が、トマト病原型 CDC と相同性を示す CDC 様染色体 (proto-CDC) を保有することが明らかとなった (赤木ら, 2019; Kodama, 2019)。本 proto-CDC はトマト病原型 CDC と同様に *isochromosome* 構造を有するが、染色体上に AAL 毒素生合成遺伝子クラスターは座乗していなかった。さらに、リンゴおよびイチゴ病原型 CDC と相同性を示す proto-CDC の保有株も見出された。以上の結果から、*Alternaria* 病原型が保有する病原性染色体は、これら proto-CDC に由来する可能性が示唆された (赤木ら, 2019; Kodama, 2019)。

一方、T 毒素生産菌であるトウモロコシごま葉枯れ病菌 (*C. heterostrophus* race T) においても、毒素生合成遺伝子座 (*Tox1*)、すなわち病原性遺伝子座が、染色体相互転座の結果として形成されたことが証明されている (Kodama *et al.*, 1999)。以上より、大規模なゲノムレベルでの変動が、HST 依存植物病原系状菌の進化と多様性形成に深く関与していることは明白である。

6. HST/病原菌感受性化の分子機構

前述したように、AAL 毒素/茎枯病菌に対する抵抗性遺伝子としてセラミド合成酵素遺伝子 *Asc1* が同定され、感受性トマト栽培品種 (*Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum*) では、*Asc1* ORF

内における 2 塩基欠失による遺伝子機能不全が見出されている。一方、中南米諸国に現存するトマト野生種では、ガラパゴス諸島のみ分布する野生種である *S. cheesmaniae* および *S. galapagense* だけが AAL 毒素高度感受性を示す。そこで、栽培品種における *Asc1* 変異が感受性野生種に由来する可能性を検証するため、*S. cheesmaniae* および *S. galapagense* における本遺伝子の変異を検証した。その結果、両野生種の *Asc1* 領域では、この 2 塩基欠失はみられないものの、他の野生種および栽培品種には存在しない 400 bp の広範な欠失が見出された(澄川ら, 2017)。また、他の全ての抵抗性トマト野生種は、本欠失を有していなかった。従って、これらガラパゴス諸島固有トマト野生種における毒素感受性化は、独自に生じている可能性が示唆された。

これらのガラパゴス固有トマト野生種は、ペルー等に自生し系統学的に最も近縁とされている野生種 *S. pimpinellifolium* に由来すると考えられている (Rodriguez et al., 2009)。*S. pimpinellifolium* はまた、栽培トマト品種の直接的な祖先種でもある。*S. cheesmaniae* および *S. galapagense* における感受性変異の原因が、ペルー本土の *S. pimpinellifolium* 由来であるかを検証するため、ペルーを中心とした中南米諸国で採取したトマト野生種の AAL 毒素感受性と *Asc1* 領域の変異を調査した (Tsunami et al., 2020)。その結果、ペルーで採取した毒素感受性を示す *S. pimpinellifolium* 株において、当該の 2 塩基欠失が見出された。しかし、*S. cheesmaniae* および *S. galapagense* において見出された 400 bp 欠失を有する系統は確認されなかった。以上の結果より、ガラパゴス固有種に生じた毒素/病害感受性化は、*Asc1* 領域の広範な欠失に由来し、さらに、両固有種は、本変異が生じた後に種分化した可能性が示唆された。一方、調査した全てのガラパゴス固有種は両変異をホモ型で保有していることが判明したため (澄川ら, 2017)、*Asc1* 欠失による毒素/病害感受性化と、ガラパゴス諸島の環境下におけるこれらトマト野生種の生存力の間に、トレードオフが存在する可能性も考えられた。

7. 宿主-寄生者相互作用の場における HST の意義と役割

HST 依存 necrotroph 病原菌が関与する植物-微生物相互作用において、宿主植物の病害抵抗反応と HST によるその制御機構には不明な点が多かった。そこで、AAL 毒素生産菌とモデル植物としてトマトおよび AAL 毒素抵抗性遺伝子 *Asc1* ホモログ (*LOH2*) を欠損し、毒素/病原菌感受性となったシロイヌナズナを用いて、抵抗反応を分子レベルで解析した。その結果、菌の侵入前抵抗性として、サリチル酸およびジャスモン酸シグナリング経路の関与を明らかにした (Egusa et al., 2009, 2013)。さらに、植物の非宿主抵抗性に関与すると考えられている *Pen* 遺伝子が、HST 生産菌に対する抵抗性発現において重要な役割を果たしていることを証明した (Egusa et al., 2013)。なお、この抵抗反応システムは、AAL 毒素耐性遺伝子 (病害抵抗性遺伝子) が欠損した感受性変異植物において、毒素の存在によって打破された。以上の結果、植物の非宿主抵抗反応機能を攪乱するという発病ストラテジーとして、*Alternaria* 属病原菌において HST 生産能が進化してきた可能性を示唆した (Egusa et al., 2009, 2013)。

一方、HST の病理学的役割のうち、特に細胞死誘導に関しては以前からの未解決な議論がある (Wolpert et al., 2002)。HST の病理学的意義が抵抗反応抑制であることは明白だが、毒素本来の性質である細胞への直接的なダメージである細胞死誘導が、HST の本質的な役割であるかどうかという問題である。光照射下や暗黒下で、HST による肉眼的な壊死斑を抑制した場合でも感染誘導が起こることから壊死誘導は本質ではないとの議論もあったが (Kohmoto et al., 1989)、細胞の褐変などが抑制されても細胞へのダメージは生じているため、結論は難しい。植物や動物細胞における細胞死は、一般的に受動的な細胞死 (壊死, ネクロシス) と能動的な細胞死 [プログラム細胞死 (PCD), アポトーシス] に大別される。病理学的には病原性菌 (の毒素等)

による細胞死はネクローシスであり、一方、特異的エリシター等によって誘導される抵抗反応である過敏感細胞死は、PCD であるとの解釈が一般的である。しかし、マイコトキシンのフモニシンや AAL 毒素によるトマト細胞での細胞死が典型的なアポトーシスであると証明されたことから (Wang *et al.*, 1996), AAL 毒素生産菌は宿主細胞に過剰な PCD を誘導し、感染成立へと導いている可能性も示されている (Wang *et al.*, 1996; Yamagishi, 2006a)。では、HST (感受性特異的毒素) と特異的エリシター (抵抗性特異的毒素) の生理・生化学作用には違いはなく、単に生産菌が necrotroph 型病原菌か、あるいは biotroph・hemibiotroph 型病原菌かで病理学的意義が正反対になってしまうのであろうか (Wolpert *et al.*, 2002) ? また、吉岡らは AAL 毒素とエリシターによる細胞死誘導のシグナリング過程に相違があることを明らかにし、両者の生理作用が同一でないことを示した (Mase *et al.*, 2013)。一方、INF1 エリシターや非特異的毒素テヌアゾン酸により細胞死を誘導した非宿主植物 *Nicotiana benthamiana* に *A. alternata* を接種した場合、菌糸進展が誘導され胞子形成に至った (江草ら, 2007)。この結果は、病理学的見地からは両者に本質的な差異はない可能性も示唆している。

細胞死誘導因子としての HST と HR 誘導エリシターの機能比較のための決定的なモデル実験として、エリシター遺伝子、あるいは HST 生合成遺伝子のヘテロログス発現実験が想定される。そこで、(hemi) biotroph 病原菌であるトマト葉かび病菌 (*Passalora fulva*) の非病原力エフェクター遺伝子 (*Avr9*) を *A. alternata* に導入・発現させ、CF9 保有トマトに対する感染行動を観察した。しかし、導入遺伝子の発現は認められたものの、トマト葉上での壊死形成までは誘導できず、結論には至らなかった (unpublished data)。今後、導入遺伝子の発現タイミングや遺伝子産物量の制御を厳密に行うことにより、HST と HR 誘導エフェクターの機能や細胞死の意義が明確になることが期待される。

8. おわりに

HST 依存 *A. alternata* 病原菌群における病原性の進化と分化の分子機構に関して、今回議論した内容は、主として病原性を支配する *Tox* クラスター/CDC が形成された後のストーリーである。しかし、糸状菌における *Tox* クラスターを含む二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの構造を眺めると、その合目的性には目を瞠る。このような遺伝子クラスターの由来、起源は何処にあるのか?そしてクラスターの集団内での拡散と保持のメカニズムは何であろうか?さらに、将来における新たな HST 生産菌や感受性植物の出現の可能性を予期し、激甚な被害を防ぐことは可能になるのか?このような疑問に答えるためには、病原菌側での二次代謝産物生合成系の進化機構解明や、植物側における毒素感受性化の分子機構に関する包括的な理解が必要である。

謝辞 本研究を進めるに当たり下記の先生、研究員、学生の方々には、共同研究、ご指導、ご助言、ご協力頂いた。ここに記して感謝の意を表す。鳥取大学：植物病理学研究室学生諸氏；農研機構：赤松 創；岡山大学：山本幹博・多賀正節；香川大学：秋光和也；信州大学：伊藤靖夫；AgResearch：R. D. Johnson, L. Johnson；Cornell Univ：B. G. Turgeon, O. C. Yoder (敬称略、当時の所属含む) また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費および文部科学省科学研究費の補助を受けて行った。

引用文献

- Akagi, Y., Akamatsu, H., Otani, H. and Kodama, M. (2009a) Horizontal chromosome transfer: a mechanism for the evolution and differentiation of a plant pathogenic fungus. *Eukaryot. Cell* 8: 1732-1738.
- Akagi, Y., Taga, M., Yamamoto, M., Tsuge, T., Fukumasa-Nakai, Y., Otani, H. and Kodama, M. (2009b) Chromosome constitution of hybrid strains constructed by protoplast fusion between the tomato and strawberry pathotypes of *Alternaria alternata*. *J. Gen. Plant Pathol.* 75:101-109.
- 赤木靖典・柘植尚志・有江力・児玉基一郎 (2019) *Alternaria alternata* トマト病原型が保有する病原性染色体の起源. 日本植物病理学会2019年度大会 (つくば市).
- Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K. (1997) AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87:967-972.
- Akimitsu, K., Tsuge, T., Kodama, M., Yamamoto, M. and Otani, H. (2014) *Alternaria* host-selective toxins: determinant factors of plant disease. *J. Gen. Plant Pathol.* 80:109-122.
- Brandwagt, B.F., Mesbah, L.A., Takken, F.L. W., Laurent, P.L., Kneppers, T.J.A., Hille, J. and Nijkamp, H.J.J. (2000) A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4961-4966.
- Cane, D.E. and Walsh, C.T. (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6:R319-R325.
- Condon, B.J., Elliott, C., González, J.B., Yun, S.H., Akagi, Y., Wiesner-Hanks, T., Kodama, M. and Turgeon, B.G. (2018). Clues to an evolutionary mystery: the genes for T-Toxin, enabler of the devastating 1970 Southern corn leaf blight epidemic, are present in ancestral species, suggesting an ancient origin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31:1154-1165.
- Covert, S.F. (1998) Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr. Genet.* 33:311-319.
- de Zelicourt, A., Montiel, G., Pouvreau, J-B., Thoiron, S., Delgrange, S., Simier, P. and Delavault, P. (2009) Susceptibility of *Phelipanche* and *Orobanchae* species to AAL-toxin. *Planta* 230:1047-1055.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev. Microbiol.* 2:414-424.
- D'mello, N.P., Childress, A.M., Franklin, D.S., Kale, S.P., Pinswasdi, C. and Jazwinski, S.M. (1994) Cloning and characterization of *LAG1*, a longevity-assurance gene in yeast. *J. Biol. Chem.* 269:15451-15459.
- Egusa, M., Akamatsu, H., Tsuge, T., Otani H. and Kodama, M. (2009) Induced resistance in tomato plants to the toxin-dependent necrotrophic pathogen *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 73:67-77.
- Egusa, M., Miwa, T., Kaminaka, H., Takano, Y. and Kodama, M. (2013) Nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria alternata* involves both pre- and postinvasive defenses but is collapsed by AAL-toxin in the absence of *LOH2*. *Phytopathology* 103:733-740
- 江草真由美・山岸大輔・岡久美子・尾谷浩・吉岡博文・児玉基一郎 (2007) INF1 エリシターおよび病原菌毒素による細胞死が *Alternaria alternata* の感染に及ぼす影響. *日植病報* 73:55
- Fox, E.M. and Howlett, B.J. (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 481-487.
- Gechev, T.S., Ferwerda, M.A., Mehterov, N., Laloi, C., Qureshi, M.K. and Hille, J. (2008) Arabidopsis AAL-toxin-resistant mutant atr1 shows enhanced tolerance to programmed cell death induced by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375:639-44.
- Gilchrist, D.G. and Grogan, R.G. (1976) Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 66:165-171.
- Ito, K., Tanaka, T., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K. and Tsuge, T. (2004) Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* 52:399-411.
- Johal, G.S. and Briggs, S.P. (1992) Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science* 258:985-987.
- Johnson, L.J., Johnson, R.D., Akamatsu, H., Salamiah, A., Otani, H., Kohmoto, K. and Kodama, M. (2000a) Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from the *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Curr. Genet.* 40:65-72.
- Johnson, R.D., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. and Kohmoto, K. (2000b) Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:742-753.
- Keller, N. (2011) The fungal treasure chest: Spore origins? *Fungal Biol. Rev.* 25:73-77.
- Khalidi N., Seifuddin F.T., Turner G., Haft D., Nierman W.C., Wolfe K.H. and Fedorova N.D. (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* 47: 736-741.
- Kessler, S. C., Zhang, X., McDonald, M. C., Gilchrist, C. L., Lin, Z., Rightmyer, A., Solomon, P.S., Turgeon, B.G. and Chooi, Y. H. (2020). Victorin, the host-selective cyclic peptide toxin from the oat pathogen *Cochliobolus victoriae*, is ribosomally encoded. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117:24243-24250.
- Khalidi N., Seifuddin F.T., Turner G., Haft D., Nierman W.C., Wolfe K.H. and Fedorova N.D. (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* 47:736-741.
- Kheder, A.A., Akagi, Y., Tsuge, T. and Kodama, M. (2012) Functional analysis of the ceramide synthase gene *ALT7*, a homolog of the plant disease resistance gene *Asc1*, in the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *J. Plant Pathol. Microbiol.* (DOI 10.4172/2157-7471.S2-001).

- 児玉基一郎・山岸大輔・赤木靖典・赤松創・尾谷浩 (2005) 植物病原糸状菌における二次代謝産物生合成と病原性—ポリケチドおよび環状ペプチドを例にして—。植物・病原体相互反応における特異性決定機構。(日本植物病理学会編), ISSN 1345-8086, pp.111-130
- 児玉基一郎 (2019) *Alternaria* 属菌の病原性進化に関する研究。日植病報 85:175-178
- Kodama, M. (2019) Evolution of pathogenicity of *Alternaria* pathogens. J. Gen. Plant Pathol. 85:471-474.
- 児玉基一郎・赤木靖典・高尾和実・柘植尚志 (2015) マイコトキシンとファイトトキシン —似て非なるもの, あるいは全く同じもの—。JSM Mycotoxins, 65:57-62.
- Kohmoto, K., Otani, H., Kodama, M. and Nishimura, S. (1989) Host recognition: can accessibility to fungal invasion be induced by host-specific toxins without necessitating necrotic cell death? In Phytotoxins and Plant Pathogenesis. pp. 249-265. Springer Berlin Heidelberg.
- Konz, D. and Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? Chem. Biol. 6: R39-R48.
- Mase, K., Ishihama, N., Mori, H., Takahashi, H., Kaminaka, H., Kodama, M. and Yoshioka, H. (2013) Ethylene-responsive AP2/ERF transcription factor MACD1 participates in phytotoxin-triggered programmed cell death. Mol. Plant-Microbe Interact. 26:868-879.
- Meehan, F. and Murphy, H. C. (1947). Differential phytotoxicity of metabolic by-products of *Helminthosporium victoriae*. Science 106:270-271.
- Mullen, T.D., Jenkins, R.W., Clarke, C.J., Bielawski, J., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2011) Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death: involvement of salvage pathway in regulating postmitochondrial events. J. Biol. Chem. 286:15929-15942.
- Pringle, R.B. and Scheffer, R.P. (1964). Host-specific plant toxins. Annu. Rev. Phytopathol. 2:133-156.
- Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D. and Desjardins, A.E. (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. Fungal Genet. Biol. 38:237-249.
- Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busman, M. and Butchko, R.A.E. (2006) Fumonisin Production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. J. Agric. Food Chem. 54: 2424–2430.
- Rodriguez, F., Wu, F., Ané, C., Tanksley, S. and Spooner, D.M. (2009) Do potatoes and tomatoes have a single evolutionary history, and what proportion of the genome supports this history? BMC Evol. Biol. 9:1-16.
- Rohlf, M., Albert, M. Keller, N.P. and Kempken F. (2007) Secondary chemicals protect mould from fungivory. Biol. Lett. 3:523–525.
- Salamiah, Akamatu, H., Fukumasa-Nakai, Y., Otani, H. and Kodama, M. (2001a) Construction and genetic analysis of hybrid strains between apple and tomato pathotypes of *Alternaria alternata* by protoplast fusion. J. Gen. Plant Pathol. 67:97-105.
- Salamiah, Fukumasa-Nakai, Y., Akamatsu, H., Otani, H., Kohmoto, K. and Kodama, M. (2001b) Genetic analysis of pathogenicity and host-specific toxin production of *Alternaria alternata* tomato pathotype by protoplast fusion. J. Gen. Plant Pathol. 67:7-14.
- Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Pocard, J. A. and Walton, J. D. (1992). The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the filamentous fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7-kilobase open reading frame. J. Biol. Chem. 267:26044-26049.
- Spassieva, S.D., Markham, J.E. and Hille, J. (2002) The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. Plant J. 32: 561-572.
- 澄川敦馬・永井瞭汰・吾郷亜希・赤木靖典・板井章浩・有江力・児玉基一郎 (2017) トマト野生種におけるトマタルターナリア茎枯病菌抵抗性遺伝子 *Asc1* の欠失は AAL 毒素感受性に関与する。平成 29 年度日本植物病理学会大会 (盛岡市)。
- Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., Harimoto, Y., Yamamoto, M. and Kodama, M. (2016a). The global regulator LacA controls biosynthesis of host-specific toxins, pathogenicity and development of *Alternaria alternata* pathotypes. J. Gen. Plant Pathol. 82:121-131.
- Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T. and Kodama, M. (2016b). Functional characterization of putative G protein-coupled receptors in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. J. Gen. Plant Pathol. 82:82-88.
- 高尾和実・赤木靖典・柘植尚志・難波英二・児玉基一郎 (2013) 非病原性 *Alternaria alternata* における宿主特異的 AAL 毒素生合成遺伝子クラスター導入菌株の作出と解析。平成 25 年度日本植物病理学会関西支部会 (岡山市)。
- Tanaka, S. (1933) Studies on black spot disease of the Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. 28:1–31.
- Tanaka, A., Takemoto, D., Chujo, T. and Scott, B. (2012) Fungal endophytes of grasses. Curr. Opin. Plant Biol. 15:462-468.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. and Otani, H. (2012) Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol. Rev. 37:44-66.
- Tsuzuki, R., Cabrera Pintado, R.M., Biondi Thorndike, J.A., Gutiérrez Reynoso, D.L., Amasifuen Guerra, C.A., Guerrero Abad, J.C., Aragón Caballero, L.M., Huarhua Zaquinula, M.H., Ureta Sierra, C., Alberca Cruz, O.I., Elespuru Suna, M.G., Blas Sevillano, R.H., Torres Arias, I.C., Flores Ticona, J., de Baldárrago, F.C., Pérez, E.R.,

- Hozum, T., Saito, H., Kotera, S., Akagi, Y., Kodama, M., Komatsu, K. and Arie, T. (2020) Mutations found in the *AscI* gene that confer susceptibility to the AAL-toxin in ancestral tomatoes from Peru and Mexico. *Plants* 10:47
- Walton, J.D. (2000) Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: An hypothesis. *Fungal Genet. Biol.* 30:167-171.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M. and Gilchrist, D.G. (1996). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8:375-391.
- Wolpert T.J., Dunkle L.D. and Ciuffetti L.M. (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:251-285.
- Yamagishi, D., Akamatsu, H., Otani, H. and Kodama, M. (2006a). Pathological evaluation of host-specific AAL-toxins and fumonisin mycotoxins produced by *Alternaria* and *Fusarium* species. *J. Gen. Plant Pathol.* 72:323-327.
- Yamagishi, D., Otani, H. and Kodama, M. (2006b). G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1280-12

植物感染生理談話会論文集 (第 57 号)

原稿受理 令和 5 年 7 月 1 8 日

印 刷 令和 5 年 8 月 1 0 日

発 行 令和 5 年 8 月 2 4 日

発行者 日本植物病理学会
会 長 増田 税
〒114-0015 東京都北区中里 2-28-10 日本植物防疫協会内
TEL : 03-5980-0281

編集者 令和 5 年度植物感染生理談話会事務局
豊田和弘・一瀬勇規・能年義輝・松井英譲
〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1
岡山大学学術研究院 環境生命自然研究学域

印 刷 アルルデザイン
〒700-0803 岡山県岡山市北区北方 1-11-22

無断複写・転載を禁ず
ISSN 1345-8086 No.56
Printed in Japan