



・助教  
・入枝 泰樹

2009年 名古屋大学大学院理学研究科 研究員  
2011年 京都大学大学院農学研究科 特定研究員  
2014年 立教大学理学部生命理学科 ポストドクトラルフェロー  
2016年 文部科学省 卓越研究員  
信州大学学術研究院（農学系） 助教

## 多犯性炭疽病菌をツールとして活用した植物免疫関連因子の新規探索

### 1. 研究の背景と目的

世界の食糧生産の約15%（5億人分の食糧に相当）が植物病害で損失しており、病害の約8割は糸状菌（カビ）病が原因である（Agrios, 2005）。病原糸状菌から植物を保護するためには糸状菌と植物の相互作用を分子レベルで理解することが重要である。一般に、植物は環境中のほとんどの病原糸状菌に対して強固な免疫系を発揮し、その攻撃を跳ね返している。しかし、例外的に特定の植物の免疫系を抑制して感染することで甚大な農作物被害をもたらす糸状菌が存在する（宿主植物と適応型菌の関係）。つまり、病原糸状菌は進化的に異なる宿主特異性を持ち、それぞれの菌種は同じ科に属する植物を中心に感染する、いわゆる宿主範囲が狭いという特性をもっている。

炭疽病は *Colletotrichum* 属菌という病原糸状菌が植物に感染して壊死斑を形成する重要病害の一つであり（Cannon *et al.*, 2012）、本属菌の大部分も限られた宿主範囲を示す。しかし、興味深いことに、植物の科を超えて感染する「多犯性」の炭疽病菌も存在し、宿主範囲の広さから果樹・野菜・花卉類を問わず農業現場で猛威を振るっている。多犯性炭疽病菌は厄介な存在だが、稀有な特性をもつ科学的に興味深い研究対象でもある。本研究では発想を転換し、多犯性炭疽病菌を植物免疫研究へ応用することを目指した。多犯性炭疽病菌でも感染できない植物（非宿主）は存在するが、それら植物の免疫系の障壁を乗り越え得る潜在能力は宿主特異性の高い炭疽病菌より高いと予想される。つまり、多犯性炭疽病菌は非宿主植物が備えるいくつかの免疫系をすでに抑制している可能性があり、まだ効力を発揮している免疫関連因子を新規に探索するツールとしての活用が期待できる（図1）。

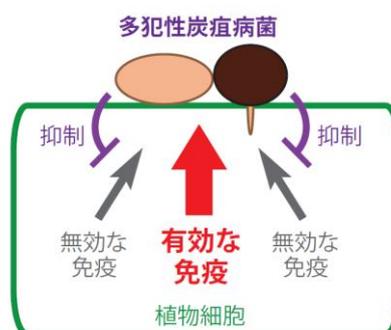


図1. 多犯性炭疽病菌と植物免疫

## 2. 研究方法

本研究は以下の3つの過程から成り、モデル植物であるシロイヌナズナ（アブラナ科）を用いて解析を行った。とくに、研究に適した多犯性炭疽病菌株を取得する過程は重要なステップである。多犯性炭疽病菌は大きく2つのクレード（*acutatum* および *gloeosporioides*）に分類され、それぞれのクレードには多くの種が含まれる。そこで、本研究では日本国内における分離・登録数が最も多い種である *Colletotrichum fioriniae*（*acutatum* クレード）を中心に3種の多犯性炭疽病菌を対象として研究を実施した。

### (1) クワ炭疽病菌に対する侵入抵抗性が低下した既知のシロイヌナズナ変異体に壊死斑を形成する多犯性炭疽病菌有用株の新規取得

炭疽病菌に対するシロイヌナズナの免疫関連因子としては、*gloeosporioides* クレードに属するクワ炭疽病菌 *C. tropicale* を用いた先行研究によって、侵入抵抗性に関わる PEN2 および EDR1、侵入後抵抗性にも関わる GSH1 の3因子が報告されている（Hiruma *et al.*, 2010; Hiruma *et al.*, 2011; Hiruma *et al.*, 2013）。そこで、本研究ではシロイヌナズナの野生型 Col-0 および侵入抵抗性低下株 *pen2*, *edr1*, *edr1pen2* 変異体を用いて、多犯性炭疽病菌 *C. fioriniae*, *C. siamense*, *C. aenigma* 各菌株の壊死斑形成を指標にシロイヌナズナの免疫を突破しやすい有用菌株の選抜を行った。

### (2) 選抜した *C. fioriniae* 有用株とクワ炭疽病菌 *C. tropicale* の比較解析

炭疽病菌に対する侵入抵抗性に関与する PEN2 および EDR1 について、既報のクワ炭疽病菌 *C. tropicale* と本研究で新規に見出した *C. fioriniae* 菌株に対する侵入抵抗性への寄与を比較解析した。解析はシロイヌナズナ各変異体上における *C. fioriniae* 有用菌株の壊死斑形成能および侵入菌糸の顕微鏡観察による侵入率測定により実施した。

### (3) 選抜した多犯性炭疽病菌有用株によるシロイヌナズナ一遺伝子変異体のスクリーニング

炭疽病菌以外の植物病原菌に対する植物免疫関連因子として、シロイヌナズナの様々な遺伝子がこれまでに報告されている。しかし、炭疽病菌に対する免疫因子は、上述のクワ炭疽病菌 *C. tropicale* を用いた研究で得られた PEN2、EDR1、GSH1 の3因子に留まっている（Hiruma *et al.*, 2010; Hiruma *et al.*, 2011; Hiruma *et al.*, 2013）。これまで20以上のシロイヌナズナ変異体がクワ炭疽病菌を用いたスクリーニングに供されたが、免疫への関与を示す結果は得られていない（Hiruma *et al.*, 2011）。また、申請者は植物が備える病原菌認識システムの免疫キナーゼ BAK1 および BIK1 がクワおよびアブラナ科炭疽病菌に対する免疫に関与することを2019年に報告したが（Irieda *et al.*, 2019）、炭疽病菌に対する植物免疫関連因子の報告例は依然として少ない。そこで、選抜した多犯性炭疽病菌有用株を活用して免疫因子を探索する新規スクリーニング系の構築を目指した。

### 3. 結果と考察

#### (1) *pen2* および *edr1* 変異体に対して壊死斑を形成する多犯性炭疽病菌株の新規同定

リンゴ、ブドウ、リンドウ、トルコギキョウ、キンセンカからそれぞれ分離された *C. fioriniae* 菌株、リンゴから分離された *C. siamense* 菌株、ソバから分離された *C. aenigma* 菌株をシロイヌナズナに接種し、病原性試験を行った。その結果、0.1%のグルコース存在下で *C. fioriniae* リンドウ分離株および *C. siamense* リンゴ分離株がシロイヌナズナ野生型 Col-0 に壊死斑を形成することが確認された。しかし、シロイヌナズナを本来宿主とするアブラナ科炭疽病菌を接種した場合とは異なり、Col-0 の壊死斑は接種部位より外側には広がらず侵入後抵抗性は維持されていると推定された。また、その他の炭疽病菌株は既報のクワ炭疽病菌 *C. tropicale* と同様に 0.1%のグルコース存在下で Col-0 には壊死斑を形成しなかったが、*C. fioriniae* リンゴ分離株以外の菌株は *pen2*, *edr1*, *edr1pen2* いずれかのシロイヌナズナ変異体に対して壊死斑形成能を有することが確認された (図 2)。以上より、シロイヌナズナの非宿主抵抗性を突破し易い多犯性炭疽病菌の有用株を複数同定することに成功した。

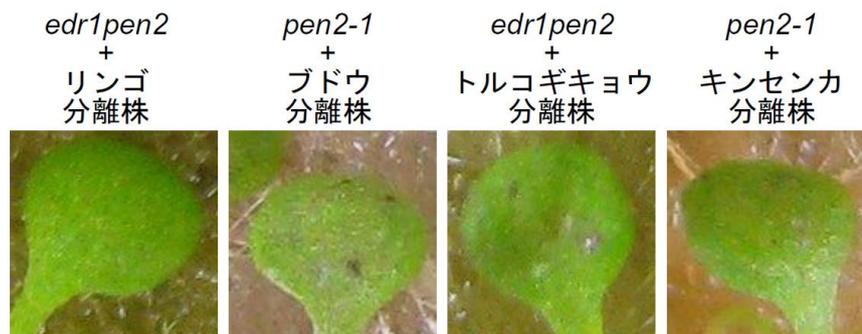


図2. *C. fioriniae*各菌株のシロイヌナズナ変異体に対する病原性試験  
リンゴ分離株以外の菌株は壊死斑を形成した。

#### (2) シロイヌナズナの PEN2 および EDR1 関連免疫と *C. fioriniae* リンドウ分離株との相互関係

既報のクワ炭疽病菌 *C. tropicale* はシロイヌナズナの野生型 Col-0 には侵入できず壊死斑も形成しないが、シロイヌナズナの変異体 *pen2*, *edr1*, *gsh1* にはそれぞれ同程度侵入可能であり、壊死斑を形成する (Hiruma *et al.*, 2010; Hiruma *et al.*, 2011; Hiruma *et al.*, 2013)。そこで、Col-0 に壊死斑を形成することを見出した *C. fioriniae* リンドウ分離株について *pen2* および *edr1* 変異体における壊死斑形成と侵入率を解析し、クワ炭疽病菌 *C. tropicale* の過去の報告と比較した。その結果、*C. fioriniae* リンドウ分離株の *edr1* 変異体における壊死斑形成と侵入率は Col-0 より大幅に上昇したが、*pen2* 変異体ではわずかしこ上昇しなかった (図 3)。この結果は、*C. fioriniae* リンドウ分離株に対する侵入抵抗性に PEN2 があまり関与しない、もしくは PEN2 関連免疫を本菌がある程度突破している可能性を示唆しており、クワ炭疽病菌 *C. tropicale* と大きく異なる特性である。

A

+ *C. fioriniae* リンドウ分離株

B

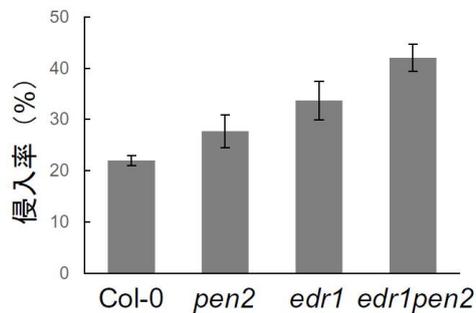


図3. *C. fioriniae* リンドウ分離株の壊死斑形成と侵入率  
シロイヌナズナのCol-0、*pen2*、*edr1*、*edr1pen2*における壊死斑形成 (A) と侵入率 (B)。

### (3) 多犯性炭疽病菌有用株を活用したシロイヌナズナの変異体スクリーニング

既報のクワ炭疽病菌 *C. tropicale* を用いたシロイヌナズナの変異体スクリーニングにおいて、*pen2*、*edr1*、*gsh1* 以外の多くの変異体は野生型 Col-0 の場合と同様に壊死斑形成を示さないことが報告されている (Hiruma *et al.*, 2011)。そこで、クワ炭疽病菌によるスクリーニングでは発見できなかった植物免疫関連因子を探索すべく、本研究で選抜した多犯性炭疽病菌の有用株を活用する新規スクリーニング系に着手した。現在、クワ炭疽病菌抵抗性への関与が示されている PEN2、EDR1、GSH1 の 3 因子を含む 23 の植物免疫関連遺伝子変異体について包括的なスクリーニングを実施している段階である。すでに複数のシロイヌナズナ因子が候補として挙がっており、本研究で選抜し取得された多犯性炭疽病菌株に対する抵抗性関連因子の新規同定が期待される。また、*gsh1* 変異が同時に存在すると *pen2* や *edr1* 変異体における壊死斑形成が低下する興味深い結果も得られた。これはクワ炭疽病菌 *C. tropicale* の先行研究で得られている結果とは逆であり、GSH1 が炭疽病菌に対する免疫を必ずしも正に制御していない可能性も浮上した。GSH1 免疫経路と他の免疫経路の関連性も含め、今後検証する必要がある。なお、上記スクリーニングはシロイヌナズナの既知の免疫関連遺伝子 (他の植物病原菌に対する抵抗性に関与すると報告されているもの) を対象にしているため、今後は未知の植物免疫因子探索に向け、変異原 (EMS) 処理を行ったシロイヌナズナ種子から育成した植物体に多犯性炭疽病菌有用株を接種するスクリーニングも実施する予定である。

#### 4. 要約

本研究では炭疽病菌の「多犯性」という能力を逆にとり、植物免疫関連因子の探索ツールとして活用することを目指した。最も重要なステップである多犯性炭疽病菌株の選抜過程では *C. fioriniae* を中心に複数の有用菌株を取得することに成功した。また、それら菌株の特性を既報のクワ炭疽病菌と比較すると同時に、植物免疫関連遺伝子の変異体スクリーニングに実際に活用できる可能性を示した。スクリーニングは現在も進行中であり、炭疽病菌への抵抗性に関与する植物免疫関連因子の同定に向けて今後も研究を継続する予定である。

#### 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、支援を賜りましたサッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、本研究は信州大学農学部微生物植物相互作用学研究室の学生諸氏の協力のもとに実施しましたのでここに謝意を表します。

#### 6. 引用文献

- Agrios, G. N. (2005) *Plant Pathology*, 5th ed. Academic Press, San Diego, CA, USA
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., and Weir, B. S. (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Stud. Micol.* 73: 181-213.
- Hiruma, K., Fukunaga, S., Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Watanabe, S., Narusaka, Y., Shirasu, K., and Takano, Y. (2013) Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 9589-9594.
- Hiruma, K., Nishiuchi, T., Kato, T., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., and Takano, Y. (2011). *Arabidopsis ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1* is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, and acts through interference of *MYC2*-mediated repressor function. *Plant J.* 67: 980-992.
- Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P., and Takano, Y. (2010). Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in *Arabidopsis* for nonhost resistance against anthracnose pathogens. *Plant Cell* 22: 2429-2443.
- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., Yamada, K., Oshikawa, Y., Saitoh, H., Uemura, A., Terauchi, R., Kitakura, S., Kosaka, A., Singkaravanit-Ogawa, S., and Takano, Y. (2019) Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116: 496-505.