

植物感染生理学の「いま」と「課題」

**PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium:
Current State and Challenges of
Plant-Microbe Interactions Research**

植物感染生理談話会論文集（第58号）

PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium Report Vol. 58

**September 1-3, 2024
Nagoya, Aichi**

日本植物病理学会
令和6年度植物感染生理談話会

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

植物感染生理学の「いま」と「課題」
PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium:
Current State and Challenges of
Plant-Microbe Interactions Research

植物感染生理談話会論文集（第 58 号）
PSJ Plant-Microbe Interactions Symposium Report Vol. 58

September 1-3, 2024
Nagoya, Aichi

日本植物病理学会
令和 6 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

植物感染生理学談話会は、1965 年（昭和 40 年）の第一回開催から、58 年を迎えることになりました。昭和 40 年に、植物病理学から植物と病原体の相互作用において、抵抗性や病原性機構に焦点を当てた研究会が発足したことには、先見の明があった先達の研究者に頭が下がる思いであります。多岐に渡る生命現象を包括する植物病理学の一翼を担う植物の生体防御機構、それを打ち破ろうとする病原体の感染戦略、これらの総合的な理解は、植物-微生物間の共進化を紐解く学問として世界で発展しています。我が国の植物病理学は、学生の育成、後進の育成、生物学の発展に寄与し、この中で植物感染生理学談話会は学問を継承しながら新たな学問領域を育んできたと思います。登壇をお願いした先生方は、植物感染生理学に関わる第一線の研究者です。このような研究者が一堂に会して、直接議論することの大切さをコロナ禍における研究会、学会等で我々は学びました。談話会開催地事務局では、感染に配慮しながら皆様が心配なく出席できる状況に感謝するとともに、特に学部生・大学院生の出席を重視した開催の在り方について話し合いました。第一線で活躍する研究者と、次世代を担う学生との直接的な交流は、新たなケミストリーを生むと考えたからです。

今回のテーマは、植物感染生理学の「いま」と「課題」とさせて頂きました。植物-微生物間相互作用に関する研究は、日々重み・深みが増しており、世界レベルで大きな流れとなっています。一方で、未解決な問題も山積しているのが現状であると考えます。本談話会においては、「微生物群と植物の相互作用」、「宿主植物の病原菌認識機構」、「病原菌の巧妙な感染戦略」、「ゲノムレベルでの抵抗性遺伝子の進化」、「相互作用機構に基づいた病害防除戦略」、さらに「出口戦略としての生物防除」などの現状について理解し、今後どのような課題を解決する必要があるのか、あるいは新たな学問の方向性について議論できたら幸甚に存じます。最後に、猛暑の中、多忙にも関わらず快くご登壇と要旨執筆をご了解頂いた講師の先生方には、末筆ながら厚く御礼申し上げます。

令和 6 年 8 月吉日
編者らしるす

目次

菌に寄生して生きる植物における菌根共生の制御メカニズム	1
三浦 千裕*・富永 貴哉**・上中 弘典* (*鳥取大学農学部生命環境学科・**奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科バイオサイエンス領域)	
植物感染糸状菌の病原から共生と多彩な感染戦略を紐解く	10
晝間 敬・Jacy Newfeld・氏松蓮 (東京大学大学院総合文化研究科)	
植物葉圏における植物微生物相互作用	19
田中 茂幸 (摂南大学農学部応用生物科学科)	
細胞応答の「個性」をどう記述し、どう理解するか?	29
別役 重之 (龍谷大学農学部生命科学科)	
土壌伝染性フザリウム病の発病機構と土壌診断への応用	40
浅井 秀太*・鮎川 侑**・有江 力***・白須 賢* (*国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター・**愛媛大学大学院 農学研究科・***東京農工大学大学院 農学研究院)	
植物が病原菌由来の分子を認識するしくみ	48
加藤 大明*・竹本 大吾**・寺内 良平*, *** (*京都大学大学院農学研究科・**名古屋大学大学院生命農学研究科・***岩手生物工学研究センター)	
病原微生物を認識する植物の NLR 受容体の分子進化	58
安達 広明*・本田 晃大*・Liu Tianpin*・松永 志基**・藤田 健太郎***・大津 美奈****・堺 俊之* (*京都大学大学院農学研究科・**京都大学農学部・***大阪大学大学院薬学研究科・****奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)	
イネ白葉枯病抵抗性遺伝子 Xa1 の栄光と没落	69
吉村 智美*・吉久 采花・山口 公志・川崎 努 (*近畿大学大学院農学研究科)	
土壌微生物叢の力を活かす：農耕地土壌の病害抑止力向上のための革新的戦略	78
清水 将文 (岐阜大学応用生物科学部)	

持続的農業生産における土壌病害の予防的管理の意義	87
--------------------------	----

吉田 重信（農研機構植物防疫研究部門）

ペプチドを介した植物の病害抵抗メカニズム	97
----------------------	----

松林 嘉克・松井 彩・大久保 祐里・大西(小川) 真理（名古屋大学大学院理学研究科）

ウリ類炭疽病菌の酸化酵素ペアによる長鎖アルデヒドの生成と植物侵入	98
----------------------------------	----

小玉 紗代*・Bastien Bissaro**・Jean-Guy Berrin**・久保 康之*（摂南大学農学部・
**INRAE, Aix Marseille Université）

宿主植物のゲノム上に展開する異種炭疽病菌に対する抵抗性遺伝子ネットワークの解明に向けて	106
---	-----

鳴坂 真理・鳴坂 義弘（岡山県農林水産総合センター生物科学研究所）

アミノ酸を介した植物保護細菌の制御	115
-------------------	-----

竹内 香純（農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門）

細胞表面受容体による植物免疫システムの進化軌跡	123
-------------------------	-----

白須 賢（理化学研究所環境資源科学研究センター）

コムギいもち病菌に対する抵抗性遺伝子の起源と進化	130
--------------------------	-----

土佐 幸雄・足助 聡一郎（神戸大学大学院農学研究科）

菌に寄生して生きる植物における菌根共生の制御メカニズム

三浦 千裕*・富永 貴哉**・上中 弘典*

Miura, C., Tominaga, T., and Kaminaka, H.

Regulatory mechanisms of mycorrhizal symbioses in plants living as parasites on fungi.

Abstract

Plants associate with various kinds of microorganisms with beneficial outcomes. Mycorrhizal symbioses are a representative interaction between plants and microorganisms because approximately 90% of terrestrial plants engage in associations with fungi in their roots. The mutual symbiotic relationship by trading nutrients between plants and fungi can be generally found in mycorrhizal symbioses, but some plants reveal mycoheterotrophy, which is a unique nutritional mode for plants to obtain carbon from associating fungi. Recently, knowledge about mycorrhizal symbioses at the molecular level has been obtained mainly in model plants such as legumes and rice, which are associated with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. AM symbiosis is known to be inhibited by gibberellin (GA), which is a classical plant hormone that regulates many physiological processes, such as plant growth, development, and environmental responses. In contrast, molecular mechanisms regulating mycoheterotrophic symbioses are still unclear. Our recent studies have revealed the novel roles of GA in mycorrhizal symbioses: its positive effect in *Paris*-type AM symbiosis in *Eustoma grandiflorum* and its negative effect on both seed germination and mycorrhizal symbiosis in orchids. This article introduces the recent data about AM and orchid mycorrhizal symbioses associated with mycoheterotrophy, accompanied by the knowledge obtained from our past research.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, branching factor, gibberellin, mycorrhizal symbiosis, orchid mycorrhizal fungi, seed germination

* 鳥取大学農学部生命環境学科 植物分子生物学的研究室 Faculty of Agriculture, Tottori University (*Corresponding author: kaminaka@tottori-u.ac.jp)

** 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科バイオサイエンス領域 植物共生学研究室 Division of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology

1. はじめに

植物は利益を享受するために、多種多様な微生物と関わり合っている。その中でも、根に菌類が定着して形成される菌根において栄養交換を行う菌根共生は、陸上植物の約9割で認められる代表的な植物-微生物間の関係である。菌根を形成する菌類は菌根菌と呼ばれるが、様々な種類の菌類が菌根菌となりうる。菌根は、植物と菌根菌の種類、およびその構造的特徴から分類されており、アーバスキュラー菌根 (AM)、外生菌根、エリコイド菌根、ラン菌根 (OM) などが知られる (Martin and van der Heijden, 2024)。一般的な菌根共生系は相利関係であり、リンや窒素などが菌根菌から植物に供給され、植物からは逆に光合成産物である炭素化合物が供給される。一方で、光合成に不利な林床等の日陰環境に進出することで、フェアトレードとされる相利関係が維持できなくなることを起因として、菌根菌から炭素化合物を受容する「菌従属栄養性」を獲得した植物種が出現してきた (Leake, 2004)。このような菌根菌に寄生した形の片利の菌根共生は AM の一部や OM などと認められる (Smith and Read, 2008)。菌従属栄養性の獲得を基とした植物と菌類の共進化により、部分的な菌従属栄養性から光合成をやめた植物種 (菌従属栄養植物) が出現してきたと考えられている。

近年、マメ科やイネなどのモデル植物における AM 共生に関する研究が盛んに行われており、共生の成立や制御に関して分子レベルでの知見が豊富に得られている。その中で、植物ホルモンであるジベレリン (GA) が AM 共生の負の制御因子として重要な役割を担っていることが明らかになっている (Takeda et al., 2015)。一方、我々は菌従属栄養性の菌根共生の分子メカニズムの解明を目指し、リンドウ科とラン科の植物を対象に研究を行ってきた。本稿では、AM 共生と OM 共生に関するこれまでの研究知見と共に、両共生において GA の新しい役割について明らかにした最近の研究成果を紹介する。

2. リンドウ科植物における *Paris* 型アーバスキュラー菌根共生の制御メカニズム

菌根菌の中でも約7割の植物が共生する AM 菌は、植物の分類群に従い異なる2つの形態型となることが知られている (Dickson, 2004)。多くの草原植物や作物では菌糸が植物根の皮層細胞間を伸長し、枝分かれした菌糸によって皮層細胞に樹枝状体が形成される *Arum* 型の菌根が認められる。一方で、多くの林床植物や一部の木本植物では菌糸が植物根の皮層細胞の間隙を伸長し、隣接する皮層細胞に順次菌糸コイルが形成される *Paris* 型の菌根が形成される。AM 菌と共生する菌従属栄養植物には必ず *Paris* 型菌根が認められるが、興味深いことに菌従属栄養植物と姉妹群を形成する光合成植物も *Paris* 型菌根を形成する (Yamato, 2004; Yamato et al., 2014)。すなわち、AM 菌と共生する植物 (AM 共生植物) の菌従属栄養性の獲得は *Paris* 型菌根を形成する植物分類群でのみ進化し得たと考えられる。

菌従属栄養性に関連する AM 共生の分子メカニズムを解明するために、我々は *Paris* 型菌根を形成し、かつ菌従属栄養植物を含む分類群であるリンドウ科に注目した。しかしながら、菌従属栄養性の AM 共生植物であるフデリンドウなどは栽培の難しい野生植物であるため (Yamato et al., 2023)、研究室内で栽培可能でかつ遺伝子組換え技術の報告があったトルコギキョウをリンドウ科における *Paris* 型 AM 共生研究のモデル植物と設定した。まず、モデル AM 菌である *Rhizophagus irregularis* を用いた接種実験系において GA 処理を行ったところ、マメ科のミヤコグサでは報告通り AM 菌の感染が抑制されたのに対し、トルコギキョウでは逆に感染が劇的に促進されることが明らかとなった (図1) (Tominaga et al.,

2020a). 特に、GA 処理したトルコギキョウの根圏では、AM 共生初期に認められる AM 菌の菌糸分岐や付着器の形成などが顕著に促進されていた。GA 処理により AM 菌の菌糸分岐促進物質であるストリゴラクトンは合成が阻害されることが報告されており (Ito et al., 2017), トルコギキョウでも同様の結果が得られた。そのため、トルコギキョウでは GA 処理によりストリゴラクトンとは異なる菌糸分岐促進物質が分泌されているのではないかと考えた。

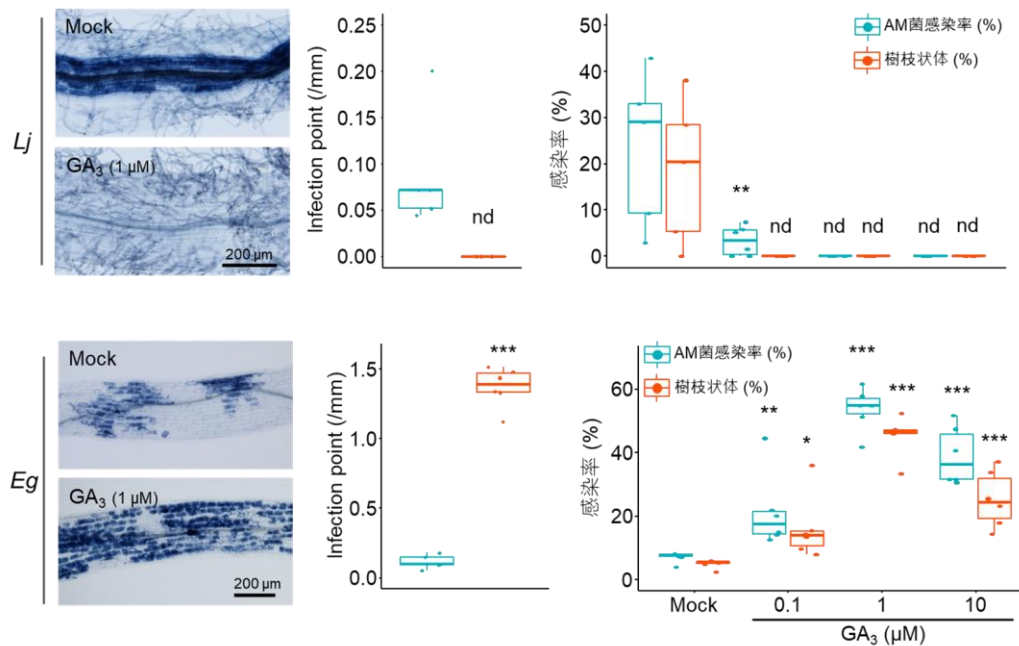


図 1. ミヤコグサ(*Lj*)とトルコギキョウ(*Eg*)におけるAM菌*Rhizophagus irregularis*の感染に対するジベレリン処理の影響評価

それぞれの植物にAM菌の胞子を接種し、4週間後の根をトリパンブルーで染色したサンプルを用いてAM菌の感染に関して定量を行った。

次に、ミヤコグサ、ニンジン、トルコギキョウの3種を用いた比較トランスクリプトーム解析を実施した (Tominaga et al., 2021). ニンジンが形成する中間型 AM では菌糸コイルが認められないものの、*Paris* 型 AM と同様に AM 菌の菌糸が皮層細胞内を伸長する特徴をもつ (Dickson, 2004). 比較トランスクリプトーム解析の結果、ミヤコグサとニンジンの菌根では、AM 共生に必須な遺伝子の発現量が GA 処理によって有意に減少した。この結果は、GA 処理による AM 菌の感染率への影響と一致していた。一方で、GA 処理により AM 菌の感染が促進されたトルコギキョウでは、AM 共生関連遺伝子の発現量は増加していた (Tominaga et al., 2020b).

最後に、我々は GA 処理したトルコギキョウがいかんして根圏における AM 菌の菌糸分岐を誘導したのか明らかにするために、トランスクリプトーム解析結果から GA 存在下で生合成が促進される二次代謝産物の同定を行い、その菌糸分岐誘導活性を評価した (Tominaga et al., 2023). トランスクリプトーム解析の結果、GA 処理したトルコギキョウ菌根でリンドウ科特有の苦み配糖体ゲンチオピクロシド (GPS) とスウェルチアマリン (SWM) の生合成経路が活性化されると示唆され、HPLC 分析でも GA 処理によるこれら化合物の内生量の増加が確認された。次に、AM 菌である *R. irregularis*, *Gigaspora margarita*, *R. clarus* を用いたバイオアッセイを行ったところ、GPS と SWM は 1–100 nM の範囲で

Rhizophagus 属菌のみの菌糸分岐を有意に促進した (図2). GPS や SWM に対する各 AM 菌種の反応は, GA 処理したトルコギキョウ根圏における菌糸分岐の様子と一致していた. さらに, GPS はトルコギキョウと系統学的に異なるチャイブならびにトマトと *R. irregularis* の共生を有意に促進した. 加えて, ストリゴラクトンとは異なり, GPS は根寄生植物の種子発芽を誘導しなかった.

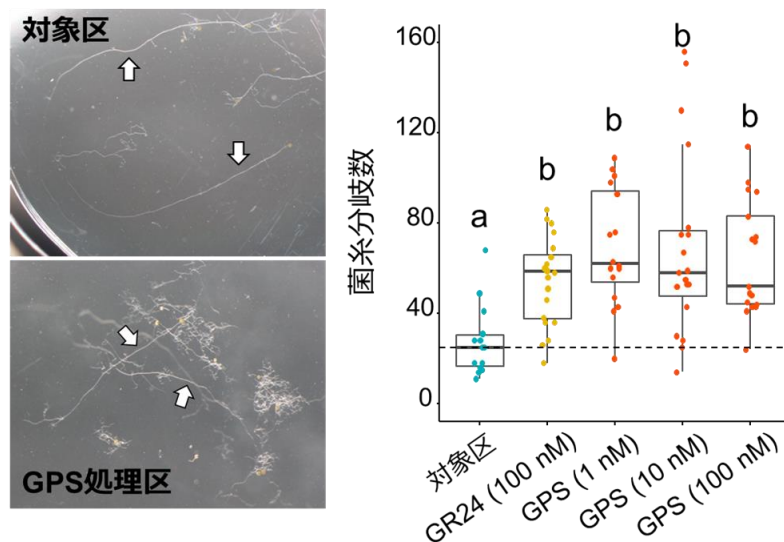


図2. AM菌*Rhizophagus irregularis*の菌糸分岐に対するゲンチオピクロシド(GPS)の影響評価

*R. irregularis*の胞子をM培地上で静置して5日間培養し、ストリゴラクトン(GR24)もしくはGPSを添加後さらに7–10日間培養したサンプルについて、実体顕微鏡下で菌糸分岐数をカウントした。

これらの結果をまとめると、トルコギキョウにおける *Paris* 型 AM 共生は, *Arum* 型や中間型の AM 共生とは全く異なる制御を受けており, そこにはリンドウ科特有のセコイリドイド配糖体である GPS や SWA などが関与していると考えられる (図3).

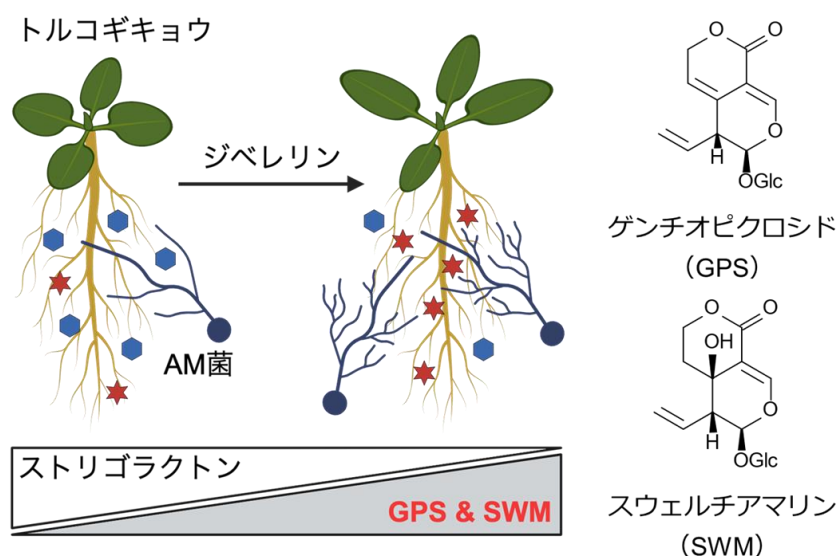


図3. リンドウ科植物トルコギキョウにおける*Paris*型AM共生

3. ラン科植物の種子発芽における菌従属栄養性の菌根共生の制御メカニズム

ラン科植物は現在 30,000 種近くが確認されており、被子植物の中でキク科と並んで最も種数の多い分類群の一つである (Christenhusz and Byng, 2016). ラン科には光合成を行って炭素源を自力で賄っている種もあれば、光合成を行わずに炭素化合物を菌根菌に依存して生きる菌従属栄養植物も含まれることから、菌根共生は種分化の要因の一つであると考えられている (Roy et al., 2013). また種子には栄養貯蔵器官が無いため、光合成できる種であっても発芽と初期成長において必ず菌根菌からの炭素化合物の獲得を必要とする。すなわち、全てのラン科植物の種子発芽は初期菌従属栄養性と呼ばれる寄生的な菌根共生により引き起こされている (Zhao et al., 2024). そこで我々は、菌従属栄養性の菌根共生の制御メカニズムをラン科植物を用いて解明するために、種子発芽のステージに注目して研究を実施してきた。具体的には、菌根菌を用いた共生発芽だけでなく、無菌発芽も可能なシラン (紫蘭) をモデル植物として設定し、同調的に発芽可能な実験系を構築した (Yamamoto et al., 2017). また同時に、発芽と共生を定量的に解析する手法も確立することで、種子発芽における菌根共生の役割を明らかにできるようになった。これらの実験手法を利用し、OM 共生が AM 共生と類似したメカニズムで制御を受けていることを明らかにした (Miura et al., 2018). また、同様の結果は、同じ自生地に生息するハマカキランの通常個体とアルビノ個体の比較解析によって得られた結果からも示唆された (Suetsugu et al., 2017).

AM 共生との類似性から、OM 共生でも GA が負の制御因子として機能すると考え、シランの種子発芽に対する GA の影響を評価した。様々な植物ホルモン処理を無菌発芽と共生発芽の両方で実施した結果、発芽に対して負に作用するアブシシン酸だけでなく、GA 処理も有意に発芽を抑制した (図 4). 一般的に GA は種子発芽の促進物質として知られるが、シランでは共生発芽だけでなく、菌根共生を介さない無菌発芽でも負に作用した。

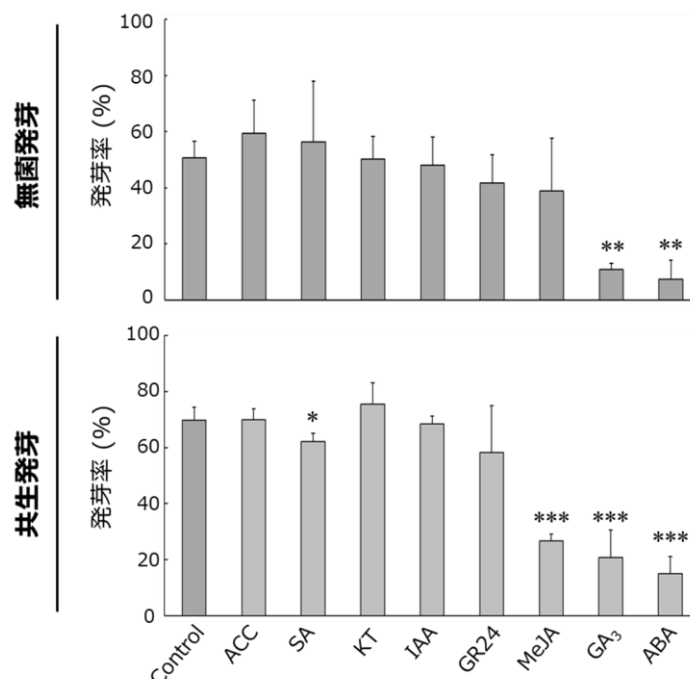


図 4. シランの発芽に対する植物ホルモン処理の影響評価

シランの種子を無菌もしくは共生菌存在下で、1 μ Mの植物ホルモンを添加した培地上で発芽させ、2週間後に測定した発芽率 (t 検定, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)。ACC: エチレン、SA: サリチル酸、KT: サイトカイニン、IAA: オーキシン、GR24: ストリゴラクトン、MeJA: ジャスモン酸、GA₃: ジベレリン、ABA: アブシジン酸。

これらの知見を踏まえ、種子発芽に菌根共生を必要とするラン科植物において、GA による発芽と共生の制御機構に関して分子レベルで明らかにするために、無菌発芽と共生発芽のサンプルについてトランスクリプトーム解析を行った (Miura et al., 2024). 遺伝子発現パターンを比較した結果、半数以上の発現変動遺伝子が無菌発芽と共生発芽で共通していた (図 5). 共通して発現変動した遺伝子の中には、共生関連の遺伝子や GA の生合成関連の遺伝子が認められた. 内生 GA 量を測定した結果、発芽時に不活性型の GA が有意に増加していた.

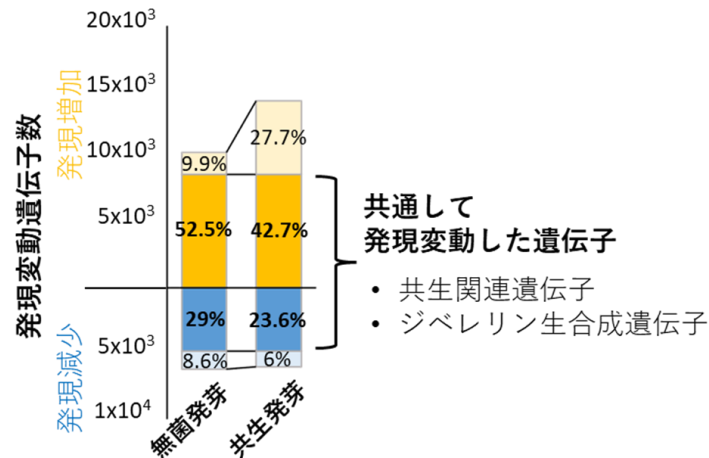


図 5. シランの発芽サンプルのトランスクリプトーム解析の結果

シランの種子を無菌もしくは共生菌存在下で培地上で発芽させ、1週間後のサンプルをRNA-seqに用いた。発芽前の種子のRNA-seqデータとの比較により、発現変動遺伝子を同定した ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 1.0$ or ≤ -1.0 , $\text{FDR} < 0.05$)。

ラン科植物は胚乳の欠落という進化の過程において発芽のポジティブレギュレーターとしての GA の役割を失った. 一方で、発芽に際して GA を積極的に不活性化させ、共生菌が定着する前から共生に必要なシステムを自動的に活性化させることで、発芽と共生を同時に進行させるメカニズムを獲得したと考えられる (図 6).

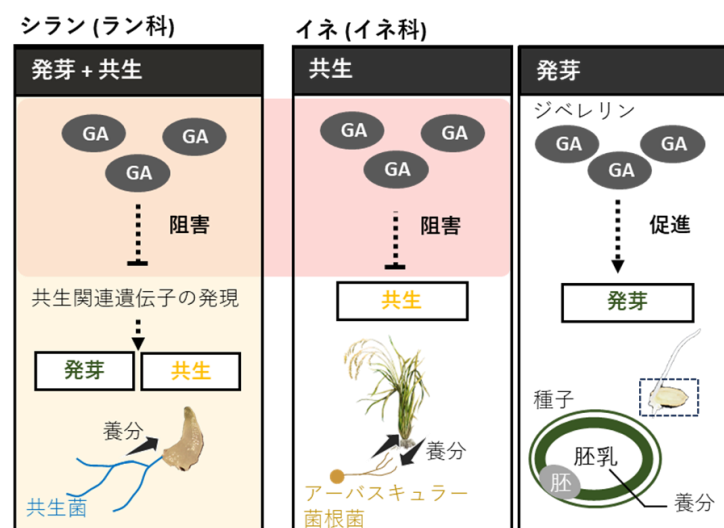


図 6. ラン科植物における菌従属栄養性の種子発芽のメカニズム

4. 最後に

植物ホルモンである GA の作用を切り口に研究を展開することで、菌従属栄養性に関わる AM と OM の両方において共生制御に関する新たな知見を得ることができた。一方で、非モデル植物を用いているため、研究が発現解析などに留まっていることが課題として残っている。今後、AM 共生植物の菌従属栄養性については、リンドウ科における菌従属栄養性の進化の分子基盤解明のために、セコイリドイド配糖体について注目した研究を継続していきたい。また、セコイリドイド配糖体は AM 菌に直接作用することから、AM 菌の感染促進を目的とした応用利用が可能であると考えられる。すでに本物質を多量に含むリンドウ科の生薬抽出液により、様々な作物種において AM 菌の感染促進が認められている(齊藤ら, 2024)。現在は、AM 菌の感染促進能を備えたバイオスティミュラントとしての製品化にも取り組んでいる。

ラン科植物に関する研究については、OM 共生研究のモデル植物として利用しているシランのゲノムの解読を完了している。現在は比較ゲノム解析より得られた情報を利用して、ゲノム内の遺伝子重複とラン科植物特有の OM 共生の関連についての研究に取り組んでいる。また、光合成ができるラン科植物の菌根菌は、病原菌としても知られるリゾクトニア属菌である (Yukawa et al., 2009)。そのため、進化の過程でラン科植物は菌類との関係を寄生から共生にスイッチさせたと考えられている。一方で、ラン科植物と共生できるリゾクトニア属菌は非常に限られており、特異性と親和性が認められる (大和・谷亀, 2009)。そのため、今後は植物側だけでなく、エフェクターの解析等を通じて共生の成立に関わる因子を菌類側からも同定することで、OM 共生の制御機構の全体像を明らかにしていきたい。

謝辞

研究の実施に関わった鳥取大学農学部生命環境農学科植物分子生物学研究室の諸氏ならびに共同研究者の方々に謝意を表します。本研究は、科学研究費補助金、鳥取県環境学術研究等振興事業、JST A-Step トライアウト、ならびに基礎生物学研究所共同利用研究の支援を受けて実施した。

引用文献

- Christenhusz MJ, Byng JW** (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*. **261**: 201-217
- Dickson S** (2004) The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **163**: 187-200
- Ito S, Yamagami D, Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Sasaki Y, Yajima S, Kyojuka J, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M, Shirasu K, Yamaguchi S, Asami T** (2017) Regulation of strigolactone biosynthesis by gibberellin signaling. *Plant Physiology* **174**: 1250-1259
- Leake JR** (2004) Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 422-428
- Martin FM, van der Heijden MGA** (2024) The mycorrhizal symbiosis: research frontiers in

- genomics, ecology, and agricultural application. *New Phytologist* **242**: 1486-1506
- Miura C, Yamaguchi K, Miyahara R, Yamamoto T, Fuji M, Yagame T, Imaizumi-Anraku H, Yamato M, Shigenobu S, Kaminaka H** (2018) The mycoheterotrophic symbiosis between orchids and mycorrhizal fungi possesses major components shared with mutualistic plant-mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 1032-1047
- Miura C, Furui Y, Yamamoto T, Kanno Y, Honjo M, Yamaguchi K, Suetsugu K, Yagame T, Seo M, Shigenobu S, Yamato M, Kaminaka H** (2024) Autoactivation of mycorrhizal symbiosis signaling through gibberellin deactivation in orchid seed germination. *Plant Physiology* **194**: 546-563
- Roy M, Gonneau C, Rocheteau A, Berveiller D, Thomas JC, Damesin C, Selosse MA** (2013) Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecological Monographs* **83**: 95-117
- 齊藤光, 酒井彩衣, 東優花, 富永貴哉, 上中弘典 (2024) リンドウ科を基源とする生薬の抽出液を用いた植物とアーバスキュラー菌根菌の共生促進. 根の研究 in press
- Smith SE, Read D** (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition), In SE Smith, D Read, eds, Academic Press, London
- Suetsugu K, Yamato M, Miura C, Yamaguchi K, Takahashi K, Ida Y, Shigenobu S, Kaminaka H** (2017) Comparison of green and albino individuals of the partially mycoheterotrophic orchid *Epipactis helleborine* on molecular identities of mycorrhizal fungi, nutritional modes and gene expression in mycorrhizal roots. *Molecular Ecology* **26**: 1652-1669
- Takeda N, Handa Y, Tsuzuki S, Kojima M, Sakakibara H, Kawaguchi M** (2015) Gibberellins interfere with symbiosis signaling and gene expression and alter colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **167**: 545-557
- Tominaga T, Miura C, Takeda N, Kanno Y, Takemura Y, Seo M, Yamato M, Kaminaka H** (2020a) Gibberellin promotes fungal entry and colonization during *Paris*-type arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Eustoma grandiflorum*. *Plant and Cell Physiology* **61**: 565-575
- Tominaga T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Yamato M, Kaminaka H** (2020b) The effects of gibberellin on the expression of symbiosis-related genes in *Paris*-type arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Eustoma grandiflorum*. *Plant Signaling & Behavior* **15**: 1784544
- Tominaga T, Miura C, Sumigawa Y, Hirose Y, Yamaguchi K, Shigenobu S, Mine A, Kaminaka H** (2021) Conservation and diversity in gibberellin-mediated transcriptional responses among host plants forming distinct arbuscular mycorrhizal morphotypes. *Frontiers in Plant Science* **12**: 795695
- Tominaga T, Ueno K, Saito H, Egusa M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kaminaka H** (2023) Monoterpene glucosides in *Eustoma grandiflorum* roots promote hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* **193**: 2677-2690
- Yamamoto T, Miura C, Fuji M, Nagata S, Otani Y, Yagame T, Yamato M, Kaminaka H** (2017) Quantitative evaluation of protocorm growth and fungal colonization in *Bletilla striata* (Orchidaceae) reveals less-productive symbiosis with a non-native symbiotic fungus. *BMC Plant Biology* **17**: 50

- Yamato M** (2004) Morphological types of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of weeds on vacant land. *Mycorrhiza* **14**: 127-131
- 大和政秀, 谷亀高広 (2009) ラン科植物と菌類の共生. 日本菌学会会報 **50**: 21-42
- Yamato M, Ogura-Tsujita Y, Takahashi H, Yukawa T** (2014) Significant difference in mycorrhizal specificity between an autotrophic and its sister mycoheterotrophic plant species of Petrosaviaceae. *Journal of Plant Research* **127**: 685-693
- Yamato M, Yagita M, Kusakabe R, Shimabukuro K, Yamana K, Suetsugu K** (2023) Impact of mycoheterotrophy on the growth of *Gentiana zollingeri* (Gentianaceae), as suggested by size variation, morphology, and ¹³C abundance of flowering shoots. *Journal of Plant Research* **136**: 853-863
- Yukawa T, Ogura-Tsujita Y, Shefferson RP, Yokoyama J** (2009) Mycorrhizal diversity in *Apostasia* (Orchidaceae) indicates the origin and evolution of orchid mycorrhiza. *American Journal of Botany* **96**: 1997-2009
- Zhao D-K, Mou Z-M, Ruan Y-L** (2024) Orchids acquire fungal carbon for seed germination: pathways and players. *Trends in Plant Science* **29**: 733-741

植物感染糸状菌の病原から共生と多彩な感染戦略を紐解く

晝間 敬*・Jacy Newfeld・氏松蓮

Hiruma, K., Newfeld, J., and Ujimatsu, R.

Molecular mechanisms underlying diverse fungal infection strategies along the Pathogenic-Mutualistic Continuum.

Abstract

Plants engage in intimate associations with microbes that exhibit a range of infection strategies, from pathogenic interactions that inhibit plant growth to mutualistic interactions that promote plant growth. It has been considered that these pathogenic and mutualistic microbes employ distinctive strategies, resulting in opposite plant growth outcomes, thereby rendering them markedly different from one another. However, recent studies on plant endophytic fungi and fungal pathogenesis suggest that, despite their contrasting outcomes, they possess remarkably similar genomes. Furthermore, alterations in a single genomic component or gene can suffice to transform an originally beneficial fungus into a pathogen, and vice versa. The deletion of a plant tryptophan-derived secondary metabolism pathway, specifically in Brassicaceae, can also convert beneficial fungi into pathogens. These results indicate that the distinctions between a pathogen and a mutualist are indeed subtle, and a microbe can exist along the Pathogenic-Mutualistic Continuum under varying host and environmental conditions. In this review, we aim to summarize recent research elucidating the molecular mechanisms underpinning diverse fungal infection strategies along the pathogenic-mutualistic continuum.

Key words: Pathogenic-Mutualistic Continuum, Tryptophan-derived metabolites, Fungal Secondary metabolism cluster, plant nutrition, *Colletotrichum*, *Arabidopsis thaliana*

東京大学大学院総合文化研究科 植物微生物相互作用研究室 Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo (*Corresponding author: hiruma@g.ecc.u-tokyo.ac.jp)

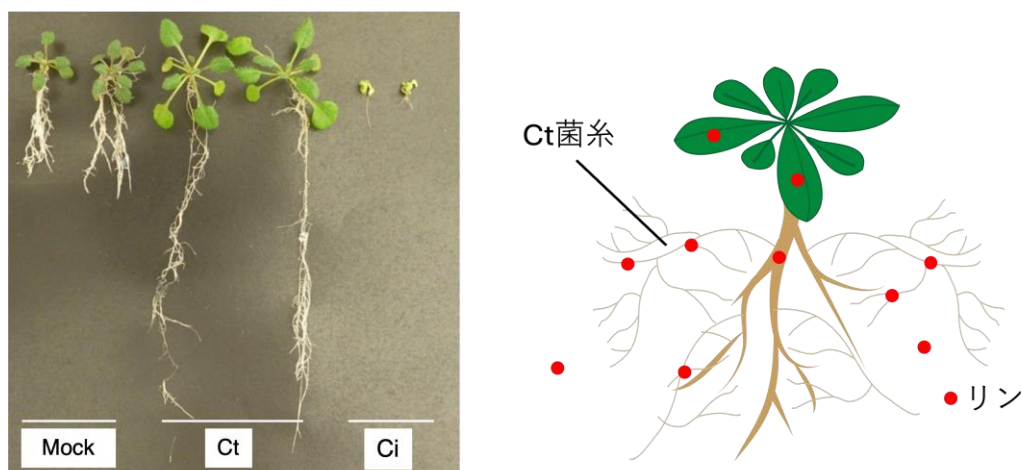
1. はじめに

植物は、多種多様な微生物と相互作用している。植物と相互作用する微生物の中には、病原菌に代表されるように、植物に様々な方法で感染し病気を引き起こすものや、糸状菌である菌根菌や細菌である根粒菌に代表されるように、リンや窒素といった植物にとっての必須栄養素を宿主植物へと供給することで植物の成長や生存に寄与する共生菌が存在する。さらには、近年のいわゆる次世代シーケンサー技術の登場により、植物の内部に少なくともその生活環の大部分において病気を引き起こすことなく棲息している内生菌と呼ばれる多様かつ無数の微生物が存在することが明らかになってきた (Fitzpatrick *et al.*, 2018; Toju *et al.*, 2018)。これまで、特に植物微生物相互作用を分子遺伝学的に紐解く際には、病原菌と共生菌はその植物成長に与える影響が対照的なことなどから、大きく異なる存在として考えられており、実際にそれぞれの菌を研究する研究領域も異なっていた。一方で、病原菌や内生菌と呼ばれる植物内部に棲息する菌の解析の結果、病原菌と共生菌がそのゲノムレベルで互いに非常に近い存在であるケースがあること (Hiruma *et al.*, 2018)、病原菌から特定の遺伝領域を欠損させると非病原菌に変化すること (Freeman and Rodriguez, 1993; Ma *et al.*, 2010)、また、植物の成長を促す共生菌が宿主の遺伝学的背景や環境条件に応じて病原菌として振る舞う例などが明らかになってきており (Hiruma *et al.*, 2018; Drew *et al.*, 2021)、病原菌か共生菌は実は紙一重の分子の違いによって引き起こされうることを示唆する知見が集まりつつある。病原・共生の違いを分子レベルで理解することは病原性や共生性の起源に迫る成果になるとともに、共生菌もゲノム上に隠し持つ病原性を確実に抑える技術の開発につながるなど、基礎研究・応用研究、双方の観点から有益だと考えられる。

そこで、本総説では、植物と相互作用する微生物の中でも、特に著者らが研究を行っている糸状菌に焦点を当てつつ、病原と共生が紙一重の分子基盤の違いによって分かれることや、一つの微生物が周囲の環境や宿主状況に応じて示す病原から共生と対極的な感染戦略を特定の分子の活性化状況を変化させていく中で連続的に移行している様について紹介する。

2. 根の内生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (Ct) はリン欠乏で植物成長を促す共生菌である

Colletotrichum 属糸状菌は、これまで、様々な植物種に炭疽病を引き起こす重要病原菌として精力的に研究が進められてきている (Talhinhas and Baroncelli, 2021)。一方で、健康な野外の植物からも *Colletotrichum* 属菌は頻繁に単離されてきており (Hiruma *et al.*, 2018)、これら健康な植物に共棲する *Colletotrichum* 属菌がどのように植物と相互作用しているかについては分かっていなかった。その中で *Colletotrichum tofieldiae* (以下, Ct) の 1 つの株 (Ct61) は、スペインの中央高原で自生する健康なモデル植物でもあるシロイヌナズナの複数の集団の葉および根から検出され、葉から表面殺菌ののちに単離された (García *et al.*, 2013; Hiruma *et al.*, 2016)。*Colletotrichum* 属菌は葉においてメラニン化した付着器を介して侵入を試みる (Kubo and Takano, 2013; Ryder and Talbot, 2015)。一方で、Ct はシロイヌナズナの葉に付着器は形成するものの侵入することはなかったことから、Ct にとってシロイヌナズナの葉は非宿主であることが考えられた。一方で、Ct は菌糸から(付着器を介さず)直接的にシロイヌナズナの根の細胞の間および内部に感染し、皮層細胞においてはその侵入菌糸は植物細胞膜に囲まれる活物共生関係を樹立した。病原型の *Colletotrichum* 属菌もその侵入菌糸が植物細胞膜に囲まれるものの、病原型との大きな違いは、植物細胞を積極的



リン欠乏 (50 μM KH_2PO_4)

図1. 根に感染して共生型と病原型の感染戦略を示す *Colletotrichum* 属菌

Colletotrichum tofieldiae (Ct) はシロイヌナズナの根に感染しリン欠乏時にはリンを植物へと供給し植物の成長を促す. 一方, 病原菌である *C. incanum* (Ci) は, シロイヌナズナの根に感染し植物の成長を著しく阻害する. Hacquard *et al.*, 2016 の一部改変. 右: Ct 菌糸を介したリンの輸送の模式図.

に殺して栄養を得る殺生段階への移行は Ct については認められなかった点である. さらに, Ct はある接種環境においては, 根に感染したのちに, その一部の菌糸が地上部へとおそらく導管を通じて移行することが判明した. 以上から, Ct は根に病気を起こすことなく感染する内生菌であり, Ct が葉からも単離された理由としては根から地上部への移行が考えられた.

Ct が単離されたシロイヌナズナは必須栄養素であるリンが顕著に枯渇した土壤環境で生育していた. そこで, リンが枯渇した環境で Ct が植物成長や生存に何らかの影響を与える可能性を考え, リン枯渇環境で Ct と植物を共培養したところ, 菌糸を介してリンを植物へと供給し植物の成長を促すことを発見した (図 1). また, その植物成長促進効果には植物のリン枯渇適応反応 (PSR) を制御する転写因子である PHR1 および PHL1 (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010) が必要であることが判明した. Ct と同様の共生機能を発揮する菌としてアーバスキュラー菌根菌が知られているが, アーバスキュラー菌根菌はアブラナ科などの一部の植物種とは共生関係を失っており, その背景には植物側が共生関係に必要な遺伝子群を欠失しているためであると考えられている (Bravo *et al.*, 2016). 一方で, シロイヌナズナと Ct との共生的関係性の維持に植物の PHR1 が必要なように, 菌根共生にも植物の PHR1 が必要であることが報告されており (Shi *et al.*, 2021; Das *et al.*, 2022), 植物の PSR に共生関係が制御されているという点で両者は共通している. また, Ct 以外にもアブラナ科の *Arabidopsis thaliana* の根に共生しリンを植物へと供給する内生糸状菌の存在が報告されている (Almaraz *et al.*, 2017). このことから, アブラナ科植物は菌根菌の代わりに Ct のような病原菌とも近縁な内生菌と共生関係を結ぶことにより, 菌根菌から受けるであろう同様の共生サービスを内生菌から受け取っていることが考えられた. また, 菌根菌と今回同定された内生菌の両者は系統的に非常に遠い関係性にも関わらずそれを受け入れる植物側のメカニズムには共通点が認められることが明らかになった. Ct とシロイヌナズナの系は他の既存の共生システムとは異なり, 菌・植物双方において遺伝子操作が可能であり, 植物にお

いてはシロイヌナズナで蓄積した種々の知見を活用できることから、植物と糸状菌の共生基盤を明らかにする上でも有益であると考えている。

3. アブラナ科植物のトリプトファン由来の二次代謝物が欠損すると Ct が病原菌化する

アブラナ科植物はワサビの辛味成分としてのインドールグルコシノレートを代表とするトリプトファン由来の二次代謝物群を生産することが知られている。これらの代謝物は虫や病原糸状菌に対する防御として重要であることが報告されている (Bednarek *et al.*, 2009; Hiruma *et al.*, 2013)。Ct は野生型のシロイヌナズナ Col-0 に対してリンが枯渇した環境下で植物の成長を促し種の数も増やすという共生関係を樹立する。一方で、トリプトファン由来の二次代謝物の合成能が欠損したシロイヌナズナ *cyp79b2 cyp79b3* 変異体においては、過剰に根に感染し植物を最悪枯死させることが判明した (Hiruma *et al.*, 2016)。下流の合成遺伝子の植物変異体の解析から、ミロシナーゼの一種である PEN2 を介したインドールグルコシノレートの合成経路が Ct との共生関係維持に必要であることが判明した (Hiruma *et al.*, 2016)。興味深いことに、この経路はシロイヌナズナの近縁種においても多型が認められており (Bednarek *et al.*, 2013)、PEN2 を有さない *Capsella rubella* の成長を Ct が阻害したことから、PEN2 経路が Ct とシロイヌナズナとの共生関係成立の鍵を握る因子であることが示唆された (Hiruma *et al.*, 2016)。子嚢菌である Ct と系統的に離れた担子菌の内生糸状菌においてもトリプトファン由来の二次代謝物が有益な相互作用を維持するために必要であることが報告されていることから (Lahrmann *et al.*, 2015; Nongbri *et al.*, 2012)、このアブラナ科植物特異的な二次代謝物群が幅広い内生菌との相互作用において重要であることが示唆される。興味深いことに、この経路は植物の PSR の制御下にあることが示唆されており (Pant *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2016)、このことは植物の PSR と植物免疫が機能的にリンクしていることを示唆しているとともに、植物は自身のリン獲得戦略の文脈の中で植物免疫を制御することで有益な内生糸状菌との関係性を制御している可能性を示唆する。この PSR と植物免疫の機能的なリンクについては、PHR1 が制御する PSR が根圏細菌群に対するサリチル酸由来の免疫応答を負に制御する報告 (Castrillo *et al.*, 2017)、PHR1 が rapid alkalization factor (RALF) のプロモーターに結合し、その受容体である FERONIA を介して Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) を認識する受容体複合体の形成を阻害することで免疫応答を抑制する報告など (Tang *et al.*, 2022)、ここ数年で知見が集積し始めている。さらには、イネいもち病菌が有し、Ct は有していないものの *Colletotrichum* 属の一部にも保存されている Nudix effector が PSR 応答を促すことで植物免疫を抑制し、病原菌の感染成立に寄与しているという報告もあり (McCombe *et al.*, 2023)、PSR の制御は感染制御もしくは成立に向けて植物微生物双方にとって重要なことが伺える。

一方で、その植物成長促進のメカニズムは不明なものの、トリプトファン由来の二次代謝物を産生しない単子葉植物の成長を Ct が促すという報告例もあり (Díaz-González *et al.*, 2020)、少なくとも特定の環境下においてはトリプトファン由来の二次代謝物が存在しなくても共生関係を構築できることを示唆しており、仮にトリプトファン由来の二次代謝物が必須ではない場合どのようなメカニズムで植物が共生関係を維持しているかは興味深い。

4. 感染戦略が共生と病原と対極的な Ct 株の比較から明らかになった菌二次代謝物遺伝

子クラスターABA-BOT

Ct 株は世界中に分布しており、双子葉植物だけでなく単子葉植物からも単離されている (Damm *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2016). これらの Ct 株は異なる環境・宿主に適応する中でそれぞれ異なる種内変異を蓄積させてきていると考えられるが、これらの変異がシロイヌナズナとの相互作用時に植物に与える影響が上述の Ct (Ct61) 株と比較して質的に変化するのかどうかは不明であった。そこで、世界中から単離された Ct 株をリンが枯渇した環境でシロイヌナズナと共培養したところ、試した Ct 株の一つを除いて Ct61 株同様に植物成長を促すことが判明した。このことは、適応する環境や宿主が異なっているとしても、少なくとも本実験系においてシロイヌナズナの植物成長を促す機能は変わらず保持していることを示唆しており、Ct による植物成長促進効果はこれらの Ct 株が分岐する前から有されていたことが示唆された。一方で、調査した菌株の一つである Ct3 株はシロイヌナズナの成長を阻害することが判明した。この成長阻害効果はコマツナ等のアブラナ科植物においても認められていることから、他の共生型の Ct 株と異なり、Ct3 株は病原型として振る舞うことが判明した (Hiruma *et al.*, 2023).

共生型と病原型とそれぞれ対照的な感染戦略を示す Ct 株がシロイヌナズナの根に感染中の比較トランスクリプトーム解析を行ったところ、共生型 Ct 株とは異なり病原型株においては感染の比較的初期に植物の植物ホルモンであり乾燥ストレス耐性や病原菌応答にも関わるアブシジン酸(ABA)経路 (Umezawa *et al.*, 2009)を活性化させること、その活性化が Ct3 による植物成長阻害効果に重要であることが判明した (Hiruma *et al.*, 2023).

病原型 Ct3 のみがその感染中に自身が持つ二次代謝物産生遺伝子クラスターの一つである ABA-botrydial クラスター (ABA-BOT)を活性化させることが判明した。この ABA および BOT 合成遺伝子は灰色カビ病菌 *Botrytis cinerea* が持つ遺伝子群と高い相同性をもち (Siewers *et al.*, 2005, 2006; Porquier *et al.*, 2016), 比較系統解析の結果、ABA および BOT 遺伝子群は系統が離れた様々な植物病原糸状菌が有すること、*B. cinerea* の BOT 遺伝子群は Ct および近縁種の *Colletotrichum* 側から水平伝搬を介して獲得されたこと、一方で、ABA 遺伝子群は BOT 遺伝子群とは異なる分布状況を示しており、Ct においては他のほとんどの菌が ABA と BOT のいずれかもしくは異なる染色体上に持つのと好対照に一つの領域に一つの遺伝子クラスターとして有していることが判明した (Hiruma *et al.*, 2023). 続いて、ABA-BOT の合成遺伝子を破壊した菌変異体の解析から、ABA-BOT がシロイヌナズナの根に感染するのに必要なこと、および、ABA-BOT の機能欠損が本来病原型の Ct 株をリン欠乏環境で植物成長を促す共生型菌へと変貌させることが明らかになった。

さらに、ABA-BOT は周囲温度環境の影響を受けることが判明し、周囲の温度環境を 22 度から 26 度へと変化させた環境では Ct3 は ABA-BOT を発現せず、植物の成長を促す共生型菌へと変化することが明らかになった (Hiruma *et al.*, 2023).

以上から、ABA-BOT の活性化状態の変化が Ct3 の病原から共生と対照的な感染戦略を周囲環境や宿主遺伝背景に応じて連続的に変化させている礎であることが考えられた。

5. Ct の共生から病原と対照的な感染戦略の連続的な移行を制御する菌転写因子

ABA-BOT が Ct3 における病原から共生にわたる感染戦略を連続的に示すために重要な因子であることが明らかになったものの、ABA-BOT は共生型 Ct においても保持されてい

るにも関わらず、感染中にその発現が誘導されないなど、その感染戦略特異的な発現制御機構については不明な点が多い。ABA-BOT を介した共生-病原連続性の制御基盤を探索する目的で、ABA-BOT クラスター内に存在する Zn_2Cys_6 型の転写因子 CtBOT6 に着目した。BOT6 は、一部の *Colletotrichum* 属菌、*Botrytis* 属菌といった植物病原糸状菌に加えて (Porquier *et al.*, 2016), 朽ちた木材を分解する腐生菌に保存されていること、CtBOT6 を共生型の Ct4 株に恒常的発現プロモーターを活用して発現させることで、ABA-BOT に属する遺伝子群の発現が顕著に上昇し、BOT 遺伝子群から生成される botrydial の中間産物の蓄積量も顕著に増大することが判明した (Ujimatsu *et al.*, 2024)。また、ABA-BOT に属する遺伝子群だけでなく、1000 を超える菌遺伝子群が BOT6 の恒常的発現によって誘導されることが判明し、その中には二次代謝物の合成に関連する遺伝子群以外にも病原性に関与することが推定されるエフェクター遺伝子や細胞壁分解酵素遺伝子群も多く含まれていた。これらの結果から、CtBOT6 の発現は ABA-BOT をはじめとする病原性関連因子群の発現に大きな影響を与えることが考えられた。

次に、CtBOT6 の恒常的発現が共生型 Ct の感染戦略に与える影響を調査した。その結果、驚くべきことに、リン枯渇状況下で植物成長を促す共生型 Ct 株が CtBOT6 の発現だけで著しく植物成長を阻害する病原型へと変貌することが判明した。CtBOT6 発現 Ct 株は根に著しく感染するだけでなく、本来は感染できない葉においても感染し次世代の無性胞子を形成するなど、非宿主組織において頑強な非宿主抵抗性を突破しその生活環を全うすることが判明した。以上からも、CtBOT6 の発現が元来植物成長を促す共生型菌を根および葉といった異なる植物組織で病気を引き起こす病原菌へと変貌させることが明らかになった。

CtBOT6 の発現レベルと菌の感染戦略との関連性をさらに調査する目的で、CtBOT6 をさ

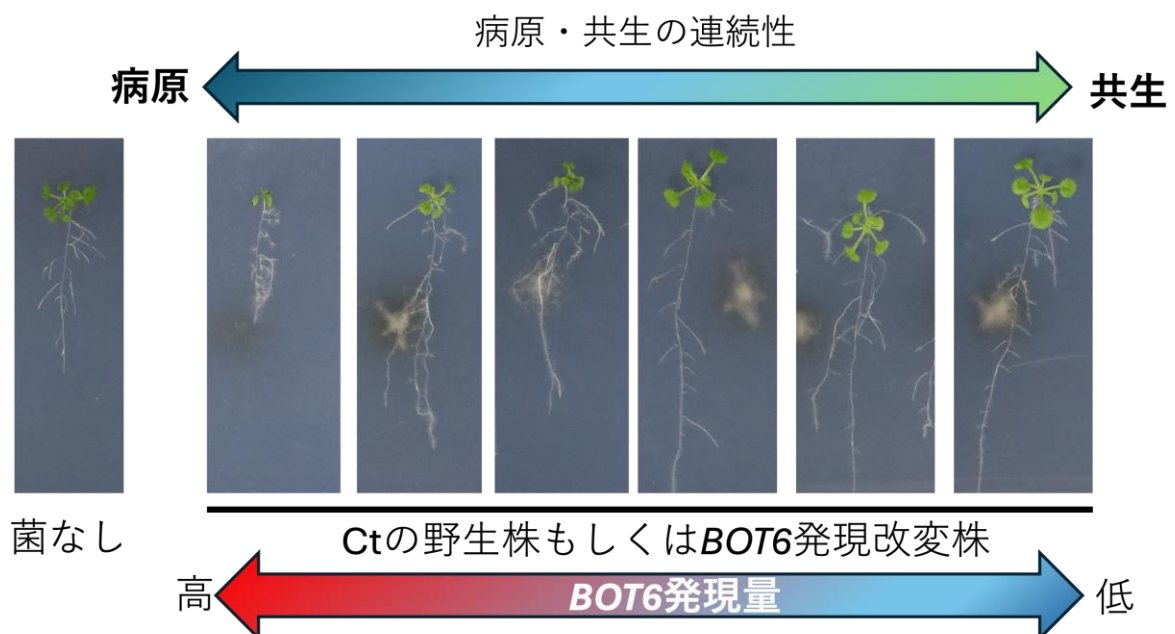


図2. 転写因子BOT6が司る植物感染糸状菌の感染戦略の連続性
BOT6を様々なレベルで発現する共生型の*Colletotrichum tofieldiae* (Ct)の形質転換株をシロイヌナズナに接種した際の植物成長。BOT6の発現レベルと病原性の強さが相関する。

さまざまな発現強度で発現する共生型 Ct 株を作出した。これらの作出株をシロイヌナズナに接種し、CtBOT6 の発現レベルと株による植物成長阻害の程度を調査したところ、CtBOT6 の発現レベルと植物成長阻害の度合いは非常に高い相関を示すことが明らかになった (図 2)。以上からも、CtBOT6 の発現レベルを変動させることで ABA-BOT および他の病原性発現関連因子群の発現を調整することで、Ct は共生から病原の連続性の軸を行き来するとともに、根と葉という異なる植物組織に感染し定着していることが想定された。

6. 最後に

本総説では、植物内生糸状菌が示す共生から病原と多彩な感染戦略を規定する分子機構に関する最近の進展を紹介した。以上の研究からも、共生菌と病原菌という存在がこれまで考えられてきたようにかけ離れた存在ではなく、実は一つの分子の活性化状況に応じて一つの菌が両者の存在を取り得る紙一重の差であること、しかも、おそらくは 1 日の環境変動の中で連続的に両者を行き来している様子を想像する結果が得られた。一方で、共生型 Ct を例に取っても根に定着している際に病原性発現につながる CtBOT6 のような分子を活性化させることがないなど、どのようにその発現を抑制しているかについては明らかではない。したがって、近い将来、共生型菌による CtBOT6 発現抑制機構も明らかになっていくことで、紙一重だと思っていた差が実は大きな差であったことを再認識することもあるかもしれない。

謝辞

本研究は、東京大学大学院総合文化研究科 植物微生物相互作用研究室のメンバーの協力のもとに行われました。また、ドイツマックスプランク研究所の Paul Schulze-Lefert 博士、フランス INRA の Richard O'Connell 博士、奈良先端科学技術大学院大学の西條雄介教授および研究室メンバー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や JST 研究費の補助を受けて行いました。

引用文献

- Almario, J., Jeena, G., Wunder, J., Langen, G., Zuccaro, A., Coupland, G., and Bucher, M. (2017). Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis alpine* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E9403-E9412. 10.1073/pnas.1710455114.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., et al. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323, 101-106. 10.1126/science.1163732.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., van Themaat, E.V.L., Maddula, R.K., Svatos, A., and Schulze-Lefert, P. (2011). Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in relatives. *New Phytol* 192, 713-726. 10.1111/j.1469-8137.2011.03824.x.
- Bravo, A., York, T., Pumplun, N., Mueller, L.A., and Harrison, M.J. (2016). Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nat Plants* 2. Artn 1520810.1038/Nplants.2015.208.
- Bustos, R., Castrillo, G., Linhares, F., Puga, M.I., Rubio, V., Perez-Perez, J., Solano, R., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2010). A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 6, e1001102. 10.1371/journal.pgen.1001102.

- Castrillo, G., Teixeira, P.J., Paredes, S.H., Law, T.F., de Lorenzo, L., Feltcher, M.E., Finkel, O.M., Breakfield, N.W., Mieczkowski, P., Jones, C.D., et al. (2017). Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* 543, 513-518. 10.1038/nature21417.
- Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F., and Crous, P.W. (2009). species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Divers* 39, 45-87.
- Das, D., Paries, M., Hobecker, K., Gigl, M., Dawid, C., Lam, H.M., Zhang, J., Chen, M., and Gutjahr, C. (2022). PHOSPHATE STARVATION RESPONSE transcription factors enable arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nat Commun* 13, 477. 10.1038/s41467-022-27976-8.
- Díaz-González, S., Marín, P., Sánchez, R., Arribas, C., Kruse, J., González-Melendi, P., Brunner, F., and Sacristán, S. (2020). Mutualistic Fungal Endophyte Ct0861 Colonizes and Increases Growth and Yield of Maize and Tomato Plants. *Agronomy-Basel* 10. ARTN 1493 10.3390/agronomy10101493.
- Drew, G.C., Stevens, E.J., and King, K.C. (2021). Microbial evolution and transitions along the parasite-mutualist continuum. *Nat Rev Microbiol* 19, 623-638. 10.1038/s41579-021-00550-7.
- Freeman, S., and Rodriguez, R.J. (1993). Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260, 75-78. 10.1126/science.260.5104.75.
- García, E., Alonso, A., Platas, G., and Sacristán, S. (2013). The endophytic mycobiota of. *Fungal Divers* 60, 71-89. 10.1007/s13225-012-0219-0.
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Munch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R., Weimann, A., Damm, U., Dallery, J.F., Hainaut, M., et al. (2016). Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat Commun* 7, 11362. 10.1038/ncomms11362.
- 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 U S A* 110, 9589-9594. 10.1073/pnas.1305745110.
- Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristan, S., Nakano, R.T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramirez, D., Bucher, M., O'Connell, R.J., and Schulze-Lefert, P. (2016). Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 165, 464-474. 10.1016/j.cell.2016.02.028.
- Hiruma, K., Kobae, Y., and Toju, H. (2018). Beneficial associations between Brassicaceae plants and fungal endophytes under nutrient-limiting conditions: evolutionary origins and host-symbiont molecular mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* 44, 145-154. 10.1016/j.pbi.2018.04.009.
- Hiruma, K., Aoki, S., Takino, J., Higa, T., Utami, Y.D., Shiina, A., Okamoto, M., Nakamura, M., Kawamura, N., Ohmori, Y., et al. (2023). A fungal sesquiterpene biosynthesis gene cluster critical for mutualist-pathogen transition in *Colletotrichum tofieldiae*. *Nat Commun* 14, 5288. 10.1038/s41467-023-40867-w.
- Fitzpatrick, C.R., Copeland, J., Wang, P.W., Guttman, D.S., Kotanen, P.M., and Johnson, M.T.J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1157-E1165. 10.1073/pnas.1717617115.
- Kubo, Y., and Takano, Y. (2013). Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in. *J Gen Plant Pathol* 79, 233-242. 10.1007/s10327-013-0451-9.
- Lahrmann, U., Strehmel, N., Langen, G., Frerigmann, H., Leson, L., Ding, Y., Scheel, D., Herklotz, S., Hilbert, M., and Zuccaro, A. (2015). Mutualistic root endophytism is not associated with the reduction of saprotrophic traits and requires a noncompromised plant innate immunity. *New Phytol* 207, 841-857. 10.1111/nph.13411.
- Ma, L.J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464, 367-373. 10.1038/nature08850.

- McCombe, C.L., Wegner, A., Zamora, C.S., Casanova, F., Aditya, S., Greenwood, J.R., Wirtz, L., Paula, S., England, E., Shang, S., Ericsson, D.J., Ely, O.G., Williams, S.J., and Schaffrath, U. (2023). Plant pathogenic fungi hijack phosphate starvation signaling with conserved enzymatic effectors. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.11.14.566975>.
- Nongbri, P.L., Johnson, J.M., Sherameti, I., Glawischnig, E., Halkier, B.A., and Oelmüller, R. (2012). Indole-3-Acetaldoxime-Derived Compounds Restrict Root Colonization in the Beneficial Interaction Between Roots and the Endophyte. *Mol Plant Microbe In* 25, 1186-1197. 10.1094/Mpmi-03-12-0071-R.
- Pant, B.D., Pant, P., Erban, A., Huhman, D., Kopka, J., and Scheible, W.R. (2015). Identification of primary and secondary metabolites with phosphorus status-dependent abundance in *Arabidopsis thaliana*, and of the transcription factor PHR1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation. *Plant Cell Environ* 38, 172-187. 10.1111/pce.12378.
- Porquier, A., Morgant, G., Moraga, J., Dalmais, B., Luyten, I., Simon, A., Pradier, J.M., Amselem, J., Collado, I.G., and Viaud, M. (2016). The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)₂Cys₆ transcription factor BcBot6. *Fungal Genet Biol* 96, 33-46. 10.1016/j.fgb.2016.10.003.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martín, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Gene Dev* 15, 2122-2133. DOI 10.1101/gad.204401.
- Ryder, L.S., and Talbot, N.J. (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* 26, 8-13. 10.1016/j.pbi.2015.05.013.
- Sato, T., Moriwaki, J., and Kaneko, S. (2015). Anthracnose Fungi with Curved Conidia, *Colletotrichum* spp. belonging to Ribosomal Groups 9-13, and Their Host Ranges in Japan. *Jarq-Jpn Agr Res Q* 49, 351-362.
- Shi, J., Zhao, B., Zheng, S., Zhang, X., Wang, X., Dong, W., Xie, Q., Wang, G., Xiao, Y., Chen, F., et al. (2021). A phosphate starvation response-centered network regulates mycorrhizal symbiosis. *Cell* 184, 5527-5540 e5518. 10.1016/j.cell.2021.09.030.
- Siewers, V., Kokkelink, L., Smedsgaard, J., and Tudzynski, P. (2006). Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold. *Appl Environ Microb* 72, 4619-4626. 10.1128/Aem.02919-05.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Gronover, C.S., Pradier, J.M., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. (2005). Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol Plant Microbe In* 18, 602-612. 10.1094/Mpmi-18-0602.
- Talhinhas, P., and Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Divers* 110, 109-198. 10.1007/s13225-021-00491-9.
- Tang, J., Wu, D.S., Li, X.X., Wang, L.F., Xu, L., Zhang, Y., Xu, F., Liu, H.B., Xie, Q.J., Dai, S.J., et al. (2022). Plant immunity suppression via PHR1-RALF-FERONIA shapes the root microbiome to alleviate phosphate starvation. *Embo J* 41. ARTN e109102 10.15252/embj.2021109102.
- Toju, H., Peay, K.G., Yamamichi, M., Narisawa, K., Hiruma, K., Naito, K., Fukuda, S., Ushio, M., Nakaoka, S., Onoda, Y., et al. (2018). Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat Plants* 4, 247-257. 10.1038/s41477-018-0139-4.
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana*. *P Natl Acad Sci USA* 106, 17588-17593. 10.1073/pnas.0907095106.
- Ujimatsu, R., Takino, J., Nakamura, M., Haba, H., Minami, A., and Hiruma, K. (2024). A fungal transcription factor BOT6 facilitates the transition of a beneficial root fungus into an adapted anthracnose pathogen. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2024.03.10.584252>.

植物葉圏における植物微生物相互作用

田中 茂幸

Tanaka, S.

Plant-microbe interactions in the plant phyllosphere

Abstract

Plant leaves are colonized by various microbes, including fungi and bacteria. While most of these phyllosphere microbes are not directly harmful, some can be pathogenic to plants. We are interested in plant biotrophic fungal pathogens, which secrete effector proteins into plant cells to establish intimate relationships with their host plants by suppressing plant immune systems and modulating metabolic pathways. Since the infection hyphae of biotrophic fungi are encased by membrane structures, the fungi need to deliver effector proteins into plant cells across these membranes. However, it is still unclear how biotrophic fungi deliver effector proteins into plant cells. To uncover the delivery system of effector proteins, we focus on the extracellular vesicles secreted by the corn smut fungal pathogen *Ustilago maydis*. In axenic culture conditions, *U. maydis* secretes extracellular vesicles during filamentous growth. We found that the extracellular vesicles of *U. maydis* contain a large number of various proteins lacking signal peptides and long noncoding RNAs. We present the current progress of the possible extracellular vesicle-mediated delivery of such molecules and its function. Besides studying extracellular vesicles, we are also interested in fungus-bacteria interactions in the plant phyllosphere. We isolated some culturable bacteria from the leaves of *Arabidopsis thaliana* and assessed their contribution to the virulence of the anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*. Among these bacteria, we found that the non-plant pathogenic bacterium *Chitinophaga* sp. facilitates the virulence of *C. higginsianum*. We would also like to introduce how such bacteria impact fungal virulence.

Key words: *Ustilago maydis*, effector, extracellular vesicle, long noncoding RNA, *Colletotrichum*

* 摂南大学農学部 植物環境微生物学研究室 Faculty of Agriculture, Setsunan University
(*Corresponding author: shigeyuki.tanaka@setsunan.ac.jp)

1. はじめに

植物葉圏には、多種多様な微生物が共存している(Vorholt, 2012; Remus-Emsermann and Schlechter, 2018)。ほとんどは植物にとって直接的な影響を及ぼさないが、一部は植物にとって病原菌となる。様々な病原菌の中でも、植物病害の主な原因は糸状菌の感染によるものであり、重要病害の中では活物寄生性の感染様式を持つものがよく知られている(Fisher et al., 2012)。活物寄生は、生きた植物細胞にのみ感染が成立する寄生様式である(Mendgen and Hahn, 2002; Meadows, 2011)。この植物との緊密な関係の確立は、病原菌が分泌する何らかの物質により、植物細胞が操作された結果であると考えられる。これまで世界的に、病原菌が分泌する比較的分子量が小さく、かつ機能未知なタンパク質であるエフェクタータンパク質が、植物細胞を操作する物質として研究が進められてきた(Lo Presti et al., 2015; Tanaka et al., 2015b; Tanaka and Kahmann, 2021)。

著者らは、活物寄生菌の寄生確立にかかわる分子機構を明らかにすることを目的に、トウモロコシに感染する活物寄生菌であるトウモロコシ黒穂病菌を実験材料として用いている。トウモロコシ黒穂病菌は、生活環の中で、腐生生活が可能な酵母様細胞による出芽増殖と、活物寄生による菌糸生育を行う二形成真菌である(Brefort et al., 2009; Matei and Doehlemann, 2016)。感染により引き起こされる特徴的な病徴は、植物細胞の腫瘍化であり(図1)、植物細胞の代謝系リプログラミングや異常な細胞増殖が引き起こされる(Doehlemann et al., 2008; Brefort et al., 2009; Matei et al., 2018)。ゲノム中には数百の機能未知分泌タンパク質がコードされており、一部は遺伝子クラスターを形成している(Kamper et al., 2006; Brefort et al., 2014; Navarrete et al., 2021)。これまで著者らは、本菌において病原性に寄与するエフェクタータンパク質の同定と機能解析を試み、植物への寄生確立に重要な役割を果たすエフェクタータンパク質を報告している(Brefort et al., 2014; Tanaka et al., 2014; Tanaka et al., 2015a; Tanaka et al., 2019; Tanaka et al., 2020; Schuster et al., 2024)。



図1 トウモロコシ黒穂病菌の病徴

活物寄生の特徴として、侵入した糸状菌の菌糸は植物細胞膜により包まれているという点が挙げられる(図2)(Petre and Kamoun, 2014; Lo Presti and Kahmann, 2017)。そのため、高分子であるエフェクタータンパク質は、細胞外へ分泌されたのち、そのままでは植物細胞膜を通過し細胞内へと移行することができない。細菌の Type III 分泌装置のような特殊な装置を持たない真菌が、どのようにエフェクタータンパク質を植物細胞へと送り込んでいくかは、未だ明らかになっていない。この問題を明らかにするため、著者らは細胞外小胞に着目して研究を行っている。細胞外小胞は、脂質二重層の膜構造で形成された直

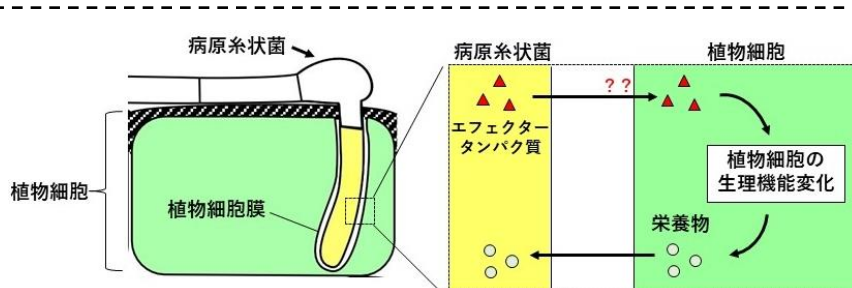


図2 活物寄生菌による植物細胞への感染の模式図

径 100 nm 程度の微小顆粒であり、細胞外に分泌される(van Niel et al., 2018; Kalluri and LeBleu, 2020)。内部に様々な分子を内包しており、その役割については動物細胞を中心に研究がよく進められている。特に、動物細胞の例では、細胞外小胞は受け取り側の細胞に取り込まれることで内包されている分子を受け渡す「分子の運び屋」として機能することが知られている(O'Brien et al., 2020; Herrmann et al., 2021)。そこで著者らは、微生物-植物という cross-kingdom の関係においても細胞外小胞がエフェクタータンパク質をはじめとした分子の輸送装置として機能するという仮説をもとに、その分子基盤を解明することを目的として研究を行っている。本稿では、その進捗現況について紹介したい。

また、著者らは、病原菌-植物間の相互作用だけでなく、葉圏における微生物-微生物間相互作用についても関心をもって研究を行っている。植物葉圏では、上述の病原菌と宿主植物との相互作用だけでなく、葉圏に普遍的に存在するその他の微生物同士の相互作用も実在すると考えられる(Vorholt, 2012; Chaudhry et al., 2021; Schafer et al., 2023)。葉圏において最も豊富に存在する微生物は細菌である(Lindow and Brandl, 2003; Whipps et al., 2008)。これら細菌のほとんどは植物にとって直接的には病原菌として機能せず、病害発生においてその存在は重要視されていない。しかし著者らは、これら非病原性細菌も発病において何らかの関与があるのではないかと考えている。本稿の後半では、植物葉から単離した非病原性細菌と病原性真菌との相互作用について、現在取り組んでいる内容を紹介したい。

2. トウモロコシ黒穂病菌における細胞外小胞の単離とオミクス解析

病原菌由来の細胞外小胞の役割について調べるため、まず、トウモロコシ黒穂病菌から細胞外小胞の単離を試みた。トウモロコシ黒穂病菌の野生型においては菌糸誘導を培地条件で行うことは難しいが、遺伝的に改変された変異体である AB33 系統は、窒素含有最小培地において活物寄生を模した菌糸誘導を行うことが可能である(Brachmann et al., 2001; Tollot et al., 2016)。この条件で培養した培養上清をフィルターろ過したのち超遠心を行うと、ペレットの形成が確認された。これを電子顕微鏡により観察すると、微小顆粒が観察された(図 3)。また、得られたペレットについてナノ粒子トラッキング

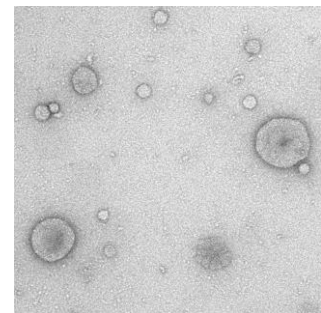
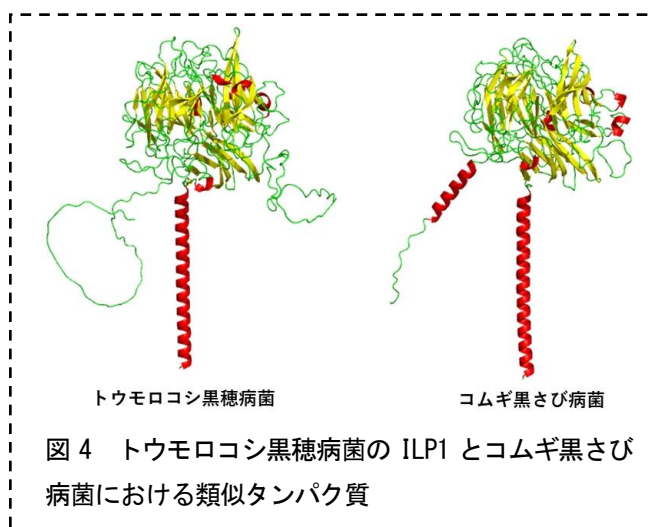


図 3 トウモロコシ黒穂病菌の細胞外小胞

解析を行ったところ、ペレットは直径 100 nm を中心とした粒子集団であることが明らかになった。これを細胞外小胞とし、タンパク質の抽出および RNA 抽出を行い、それぞれプロテオーム解析および RNA-seq 解析に供試した。その結果、細胞外小胞には多様なタンパク質が含まれ、約 8 割はシグナルペプチド配列を持たないものであった。さらに、細胞外小胞には mRNA および数百種の long noncoding RNA が含まれることが明らかになった。細胞外小胞を単離するための培養条件では、エフェクター遺伝子は発現していない。そのため、既知エフェクター遺伝子を恒常発現する変異体を作成し、これより単離した細胞外小胞にエフェクタータンパク質が含まれるかをウェスタンブロットで確認したところ、エフェクタータンパク質が検出された。このことから、エフェクタータンパク質は小胞体-ゴルジを介した分泌経路だけでなく、細胞外小胞を介した分泌経路が存在することが示唆された。

3. 細胞外小胞膜上に局在するタンパク質 INTEGRIN-LIKE PROTEIN 1 (ILP1)

細胞外小胞の膜は脂質二重層で構成されるため、細胞膜挿入型の蛍光試薬で染色することが可能である(Morales-Kastresana et al., 2017; Andronico et al., 2021)。細胞外小胞が植物細胞に取り込まれるかどうかを、蛍光標識した細胞外小胞とトウモロコシ葉由来のプロトプラストと共培養すると、プロトプラスト細胞膜が蛍光標識された。このことから、細胞外小胞と細胞膜間の膜融合が生じることが推測された。前述のプロテオーム解析の結果から、細胞外小胞にはいくつかの機能未知膜タンパク質が含まれていることがわかっている。これらについて遺伝子欠損株を作出し、病原性が低下するものを選抜した。その結果、膜一回貫通型であり、N末端の構造がインテグリンのN末端側と似た構造を持つタンパク質が同定された(図4)。この膜タンパク質を INTEGRIN-LIKE PROTEIN 1



(ILP1) とし、欠損株由来の細胞外小胞と植物プロトプラストを共培養すると、細胞膜の蛍光標識効率に低下がみられた。このことから、細胞外小胞の膜上タンパク質が、植物細胞膜との相互作用に重要であることが示唆された。ILP1 はコムギ黒さび病菌をはじめとして(図4)、担子菌に属する他の病原菌にも構造レベルで似たタンパク質が保存されており、活物寄生に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。動物細胞においては、インテグリンのN末端は Extracellular matrix (ECM) との相互作用が知られているが(Kanchanawong and Calderwood, 2023)、細胞外小胞上にもインテグリンが存在し、ECMと相互作用を果たすことが示唆されている(Debnath et al., 2023)。現在は、この ILP1 のN末端側と結合するリガンドとなる分子の同定を、共免疫沈降法や近接標識法とプロテオーム解析を組み合わせて試みている。

4. 細胞外小胞に含まれる long noncoding RNAs

動物細胞などでは、細胞外小胞には低分子 RNA が含まれることが報告されている(Wei et al., 2017; O'Brien et al., 2020; Garcia-Martin et al., 2022)。同様に、植物の病原真菌由来の細胞外小胞に低分子 RNA が含まれることが知られている(Cheng et al., 2023)。一方、トウモロコシ黒穂病菌は RNAi 機構をコードする遺伝子がゲノム上から欠失しているため(Laurie et al., 2008; Laurie et al., 2012)、低分子 RNA が生成されるかは不明であった。著者らは、本菌は RNase T2 酵素により切断された tRNA 断片を細胞内で多量に生成しており、また tRNA 断片は細胞外へ分泌されることを明らかにしている(Yoshimoto et al., 2022)。tRNA の細胞内局在観察の結果から、tRNA 断片は分泌小胞を介して分泌されていると予想している(Yoshimoto et al., 2022)。これを裏付けるように、細胞外小胞 RNA-seq 解析では、tRNA 断片のような低分子 RNA の存在は認められなかった。ところが、細胞外小胞には多種多様な long noncoding RNA (lncRNA) が含まれることが明らかになった。

これらの多くはトウモロコシ黒穂病菌ゲノムの遺伝子間領域から転写されており、数百種の lncRNA のうち多くは非常に高レベルで発現していることがわかった。これら lncRNA が実際に分子として存在しているかどうかをノーザンブロットで調べたところ、予想サイズの RNA が検出された。特定の lncRNA について *in-situ* hybridization を行くと、菌糸細胞内で顆粒状に局在していることが確認された(図 5)。この構造は、細胞外小胞を含んだ Multi vesicular body であると推測している。トウモロコシ黒穂病菌の lncRNA は、近縁の黒穂病菌においてのみ配列が保存されており、黒穂病菌以外の菌では類似配列は見いだされなかった。さらに、RNA-seq データから、これら lncRNA は Poly-A 修飾がされていないものが非常に多いことがわかった。いくつかの lncRNA については、実際に Poly-A 修飾がされていないことを、実験的に確認している。動物細胞などでは lncRNA は PolII により転写され、Poly-A 修飾を受けるものが多いとされている(Statello et al., 2021; Mattick et al., 2023)。そのため著者らは、トウモロコシ黒穂病菌の lncRNA が、どのように転写されているかについても関心を持っている。また、トウモロコシ黒穂病菌における lncRNA の、病原性への関与を調べた。発現量が高い数種に着目し、転写領域を欠損させた変異体を作成して病原性試験を行った。その結果、病原性が低下するものが確認された。現在、これら lncRNA の機能を明らかにするため、lncRNA と結合するタンパク質の同定を試みている。



図 5 トウモロコシ黒穂病菌における lncRNA 局在

5. 植物葉から単離された非病原性細菌が病原性糸状菌に与える影響

ここまで、トウモロコシ黒穂病菌の細胞外小胞を介した植物との相互作用について紹介した。一方で、著者らは、病原菌-植物間の相互作用だけでなく、非病原性細菌-病原菌間相互作用についても関心をもって研究を行っている。この相互作用を研究する上では、シロイヌナズナとそれに感染する病原糸状菌であるアブラナ科炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum* ; 以下 Ch) を実験材料として使用した。まず、シロイヌナズナの葉から培養可能な細菌を単離した。この単離した細菌を Ch の孢子と混ぜ、シロイヌナズナ葉に接種した。シロイヌナズナ葉に形成された病斑面積を測定したところ、細菌を混ぜなかった対象区 (i.e. Ch のみ) と比較し、有意に病斑面積が大きくなる細菌が見つかった(図 6)。ゲノム解析を行ったところ、この細菌は *Chitinophaga* 属細菌であることがわかった。*Chitinophaga* 属細菌は植物にとっては非病原性の細菌であり、主に土壌などから単離報告されている(He

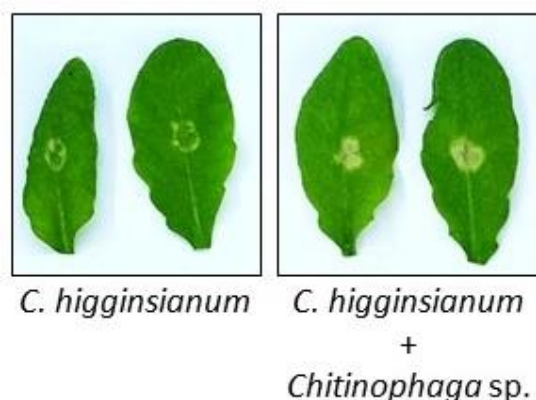


図 6 *Chitinophaga* 属細菌存在下における *C. higginsianum* の病原性

et al., 2022; Han et al., 2023; Trinh and Kim, 2023)。まず、*Chitinophaga* 属細菌の存在が植物の免疫応答などの遺伝子発現パターンに影響を及ぼすことで Ch の感染が促進される可能性について検討するため、RNA-seq による発現パターンの比較を行った。しかし、*Chitinophaga* 属細菌の存在下・非存在下において、植物遺伝子の発現パターンに大きな違いは見られなかった。次に、*Chitinophaga* 属細菌が Ch に何らかの影響を与えている可能性を検討するため、*Chitinophaga* 属細菌存在下での Ch の形態形成をスライドガラス上で観察した。その結果、通常一つの胞子から一つの付着器が形成されるのに対し、*Chitinophaga* 属細菌の存在下では 2 つ目の付着器（二次付着器）が新規に形成されることが明らかになった（図 7）。これは、植物葉上でも同様であり、またこの二次付着器は侵入能を有していることがわかった。このことから、*Chitinophaga* 属細菌は、Ch の二次付着器形成を促進し、感染効率を高めていることが示唆された。細菌の培養上清にも二次付着器誘導活性が見られたことから、細菌が分泌する何らかの物質によると推測している。さらに *Chitinophaga* 属細菌は、Ch により形成された病斑上でよく増殖することがわかり、Ch の感染促進により滲出した植物成分を増殖に利用していると予想される。また、*Chitinophaga* 属細菌は Ch だけ

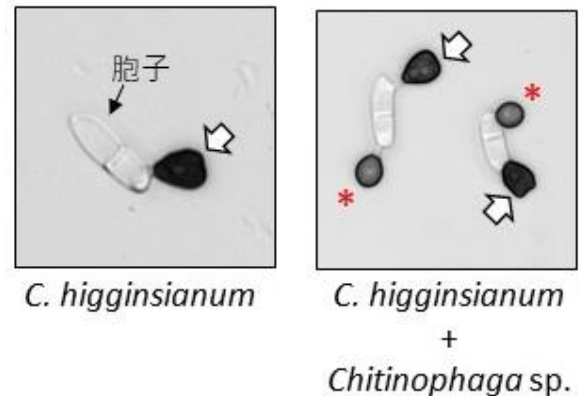


図 7 *Chitinophaga* 属細菌存在下における *C. higginsianum* の形態形成

でなく、他の炭疽病菌においても、二次付着器形成誘導や形態変化を引き起こした。加えて現時点での予備的な結果から、著者らは、*Chitinophaga* 属細菌だけでなく、同一の Bacteroidetes 門に属する他の細菌も同様の現象を引き起こすという知見を得ている。一方で、Proteobacteria 門の細菌群ではこの現象は見られなかったため、Bacteroidetes 門の細菌が分泌する何らかの物質により誘導されていると予想される。現在は、細菌が分泌する物質の同定および、細菌存在下における Ch の遺伝子発現パターンの解析を試みている。また、*Chitinophaga* 属細菌を含めた Bacteroidetes 門の細菌が、自然界の土壌や葉にどれほど普遍的に存在しているかを調べた。地理的に隔離された複数の場所において植物葉と土を採取し、微生物叢解析を行った。その結果、Bacteroidetes 門の細菌は、土壌だけでなく、葉においてもよく検出された。これは、他グループなどによる、自然界の植物葉の微生物叢解析報告の結果とも矛盾しない(Wagner et al., 2016; Massoni et al., 2020; Liu et al., 2023)。以上の結果から、植物葉圏に普遍的に存在する非病原性細菌が、炭疽病などの植物病害の発生に間接的に関与している可能性があるのではと考えている。

6. 最後に

植物葉は外界の多様な刺激や微生物にさらされており、葉圏における微生物相互作用は多様性に富んだ無数の分子相互作用研究の宝庫であると考えている。著者はこれまで、主に病原菌と植物間の相互作用についての研究を行ってきており、現在でもエフェクタータンパク質機能やその輸送機構について関心を持って研究を行っている。しかし、実際自然

界においては、病原菌の宿主への感染性は病原菌と植物間の相互作用のみだけでなく、本稿後半でふれたように、他の微生物との相互作用も密接にかかわりながら決定されているのではないかと考えている。今後は、発病における微生物—微生物間相互作用の分子機構の解明も進め、糸状菌が植物に感染し発病に至るまでには、どのような要因が絡んできているのかを明らかにしていきたい。

謝辞

本研究は、摂南大学農学部植物環境微生物学研究室の学生および実験補助員の方々により行われた。また、long noncoding RNA 研究においては、摂南大学農学部・芳本玲博士との共同研究にて遂行された。この場を借りて、お礼申し上げたい。また本研究は、日本学術振興会、国立研究開発法人科学技術振興機構および公益財団法人発酵研究所の補助を受けて行われた。

引用文献

- Andronico, L.A., Jiang, Y., Jung, S.R., Fujimoto, B.S., Vojtech, L., and Chiu, D.T. (2021). Sizing Extracellular Vesicles Using Membrane Dyes and a Single Molecule-Sensitive Flow Analyzer. *Anal Chem* 93, 5897-5905.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 42, 1047-1063.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., and Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* 47, 423-445.
- Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V., and Kahmann, R. (2014). Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 10, e1003866.
- Chaudhry, V., Runge, P., Sengupta, P., Doehlemann, G., Parker, J.E., and Kemen, E. (2021). Shaping the leaf microbiota: plant-microbe-microbe interactions. *J Exp Bot* 72, 36-56.
- Cheng, A.P., Kwon, S., Adeshara, T., Gohre, V., Feldbrugge, M., and Weiberg, A. (2023). Extracellular RNAs released by plant-associated fungi: from fundamental mechanisms to biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 107, 5935-5945.
- Debnath, K., Heras, K.L., Rivera, A., Lenzini, S., and Shin, J.W. (2023). Extracellular vesicle-matrix interactions. *Nat Rev Mater* 8, 390-402.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., and Kamper, J. (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* 56, 181-195.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186-194.
- Garcia-Martin, R., Wang, G., Brandao, B.B., Zanutto, T.M., Shah, S., Kumar Patel, S., Schilling, B., and Kahn, C.R. (2022). MicroRNA sequence codes for small extracellular vesicle release and cellular retention. *Nature* 601, 446-451.
- Han, D.M., Baek, J.H., Choi, D.G., Jin, M.S., and Jeon, C.O. (2023). *Chitinophaga horti* sp. nov., Isolated from Garden Soil. *Curr Microbiol* 80, 116.

- He, S.W., Ma, R., Zhao, Y.Y., An, L., Huang, J.H., Zhang, Q., Han, J.G., and Zhang, X.X. (2022). Chitinophaga hostae sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of Hosta plantaginea. *Int J Syst Evol Microbiol* 72.
- Herrmann, I.K., Wood, M.J.A., and Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol* 16, 748-759.
- Kalluri, R., and Lebleu, V.S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367.
- Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Muller, O., Perlin, M.H., Wosten, H.A., De Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., Mccann, M., Perez-Martin, J., Feldbrugge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., Decaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature* 444, 97-101.
- Kanchanawong, P., and Calderwood, D.A. (2023). Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 142-161.
- Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Guldener, U., Munsterkotter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G., and Schirawski, J. (2012). Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell* 24, 1733-1745.
- Laurie, J.D., Linning, R., and Bakkeren, G. (2008). Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus Ustilago hordei but not in its close relative Ustilago maydis. *Curr Genet* 53, 49-58.
- Lindow, S.E., and Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69, 1875-1883.
- Liu, J., Zhang, W., Liu, Y., Zhu, W., Yuan, Z., Su, X., and Ding, C. (2023). Differences in phyllosphere microbiomes among different Populus spp. in the same habitat. *Front Plant Sci* 14, 1143878.
- Lo Presti, L., and Kahmann, R. (2017). How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. *Curr Opin Plant Biol* 38, 19-24.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* 66, 513-545.
- Massoni, J., Bortfeld-Miller, M., Jardillier, L., Salazar, G., Sunagawa, S., and Vorholt, J.A. (2020). Consistent host and organ occupancy of phyllosphere bacteria in a community of wild herbaceous plant species. *ISME J* 14, 245-258.
- Matei, A., and Doehlemann, G. (2016). Cell biology of corn smut disease-Ustilago maydis as a model for biotrophic interactions. *Curr Opin Microbiol* 34, 60-66.
- Matei, A., Ernst, C., Gunl, M., Thiele, B., Altmuller, J., Walbot, V., Usadel, B., and Doehlemann, G. (2018). How to make a tumour: cell type specific dissection of Ustilago maydis-induced tumour development in maize leaves. *New Phytol* 217, 1681-1695.
- Mattick, J.S., Amaral, P.P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H.Y., Chen, L.L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M.E., Fitzgerald, K.A., Gingeras, T.R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J.B., Lee, J.T., Mendell, J.T., Mercer, T.R., Moore, K.J., Nakagawa, S., Rinn, J.L.,

- Spector, D.L., Ulitsky, I., Wan, Y., Wilusz, J.E., and Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24, 430-447.
- Meadows, R. (2011). Why biotrophs can't live alone. *PLoS Biol* 9, e1001097.
- Mendgen, K., and Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* 7, 352-356.
- Morales-Kastresana, A., Telford, B., Musich, T.A., Mckinnon, K., Clayborne, C., Braig, Z., Rosner, A., Demberg, T., Watson, D.C., Karpova, T.S., Freeman, G.J., Dekruyff, R.H., Pavlakis, G.N., Terabe, M., Robert-Guroff, M., Berzofsky, J.A., and Jones, J.C. (2017). Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. *Sci Rep* 7, 1878.
- Navarrete, F., Grujic, N., Stirnberg, A., Saado, I., Aleksza, D., Gallei, M., Adi, H., Alcantara, A., Khan, M., Bindics, J., Trujillo, M., and Djamei, A. (2021). The Pleiades are a cluster of fungal effectors that inhibit host defenses. *PLoS Pathog* 17, e1009641.
- O'brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L.C., and Breakefield, X.O. (2020). RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 585-606.
- Petre, B., and Kamoun, S. (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biol* 12, e1001801.
- Remus-Emsermann, M.N.P., and Schlechter, R.O. (2018). Phyllosphere microbiology: at the interface between microbial individuals and the plant host. *New Phytol* 218, 1327-1333.
- Schafer, M., Pacheco, A.R., Kunzler, R., Bortfeld-Miller, M., Field, C.M., Vayena, E., Hatzimanikatis, V., and Vorholt, J.A. (2023). Metabolic interaction models recapitulate leaf microbiota ecology. *Science* 381, eadf5121.
- Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S., Happel, P., Assmann, D., Rossel, N., Guldener, U., Mannhaupt, G., Ludwig, N., Winterberg, S., Pellegrin, C., Tanaka, S., Vincon, V., Presti, L.L., Wang, L., Bender, L., Gonzalez, C., Vranes, M., Kamper, J., Seong, K., Krasileva, K., and Kahmann, R. (2024). Novel Secreted Effectors Conserved Among Smut Fungi Contribute to the Virulence of *Ustilago maydis*. *Mol Plant Microbe Interact* 37, 250-263.
- Statello, L., Guo, C.J., Chen, L.L., and Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 96-118.
- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., Koenig, S., Feussner, K., Feussner, I., and Kahmann, R. (2014). A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *Elife* 3, e01355.
- Tanaka, S., Djamei, A., Presti, L.L., Schipper, K., Winterberg, S., Amati, S., Becker, D., Buchner, H., Kumlehn, J., Reissmann, S., and Kahmann, R. (2015a). Experimental approaches to investigate effector translocation into host cells in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *Eur J Cell Biol* 94, 349-358.
- Tanaka, S., Gollin, I., Rossel, N., and Kahmann, R. (2020). The functionally conserved effector Stal is a fungal cell wall protein required for virulence in *Ustilago maydis*. *New Phytol* 227, 185-199.
- Tanaka, S., Han, X., and Kahmann, R. (2015b). Microbial effectors target multiple steps in the salicylic acid production and signaling pathway. *Front Plant Sci* 6, 349.
- Tanaka, S., and Kahmann, R. (2021). Cell wall-associated effectors of plant-colonizing fungi. *Mycologia* 113, 247-260.
- Tanaka, S., Schweizer, G., Rossel, N., Fukada, F., Thines, M., and Kahmann, R. (2019). Neofunctionalization of the secreted Tin2 effector in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Nat Microbiol* 4, 251-257.
- Tollot, M., Assmann, D., Becker, C., Altmüller, J., Dutheil, J.Y., Wegner, C.E., and Kahmann, R. (2016). The WOPR Protein Ros1 Is a Master Regulator of Sporogenesis and Late Effector Gene Expression in the Maize Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 12, e1005697.
- Trinh, N.H., and Kim, J. (2023). *Chitinophaga nivalis* sp. nov., isolated from forest soil

- in Pyeongchang, Republic of Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 73.
- Van Niel, G., D'angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213-228.
- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10, 828-840.
- Wagner, M.R., Lundberg, D.S., Del Rio, T.G., Tringe, S.G., Dangl, J.L., and Mitchell-Olds, T. (2016). Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nat Commun* 7, 12151.
- Wei, Z., Batagov, A.O., Schinelli, S., Wang, J., Wang, Y., El Fatimy, R., Rabinovsky, R., Balaj, L., Chen, C.C., Hochberg, F., Carter, B., Breakefield, X.O., and Krichevsky, A.M. (2017). Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat Commun* 8, 1145.
- Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D., and Bending, G.D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol* 105, 1744-1755.
- Yoshimoto, R., Ishida, F., Yamaguchi, M., and Tanaka, S. (2022). The production and secretion of tRNA-derived RNA fragments in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Front Fungal Biol* 3, 958798.

細胞応答の「個性」をどう記述し, どう理解するか？

別役 重之*

Betsuyaku, S.

How do we describe and understand the “individualities” of cellular responses?

Abstract

Plant-pathogen interactions are initiated by the "recognition" of each other's presence and undergo various transitions over time. For example, the plant immune systems, such as pattern-triggered immunity (PTI) induced by the recognition of pathogen/microbe-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs) through plant pattern recognition receptors (PRRs), effector-triggered immunity (ETI) induced by the activation of NLRs upon specific recognition of corresponding pathogen effectors, and systemic acquired resistance (SAR) triggered by local pathogen infection, are now being understood at the molecular level. However, plant immunity *per se* starts from the plant cell that recognizes a pathogen and evolves into various states through the surrounding cells to the tissue and individual levels, and the PTI, ETI, and SAR described above only define a characteristic part of the spatiotemporal transition process of a series of immune responses in plants. Pathogens are also thought to exhibit virulence in various forms dynamically while attempting to multiply themselves and suppress plant immunity in the process of interaction. Live imaging is an important tool for correctly capturing such phenomena that involve spatial and temporal dynamics and understanding their molecular mechanisms. Using the patho-system between *Arabidopsis thaliana* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) as a model, our group has investigated the spatiotemporal dynamics between the two organisms by using promoter-reporter strains of marker genes, which are indicators of plant immunity and bacterial virulence, aiming at uncovering the molecular mechanisms governing them. Various new findings obtained in the process will be presented.

Key words: plant immunity, pathogenicity, *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, imaging, systems biology

* 龍谷大学 農学部生命科学科 多細胞動態研究室 Dept. Plant Life Science, Fac. Agriculture, Ryukoku University (betsu@agr.ryukoku.ac.jp)

1. はじめに

植物と病原体の相互作用は互いの存在の「認識」によって開始され、時間の経過に伴って様々に遷移していく。植物側に関しては、病原体（微生物）に広く保存された病原体関連分子パターン（Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns; PAMPs/MAMPs）が植物表面のパターン認識受容体（Pattern Recognition Receptors; PRRs）によって認識されることで起動する pattern-triggered immunity（PTI）や、その PTI を抑制して感染を成立させるために分泌されると考えられている病原体エフェクターの作用を、植物細胞内の抵抗性タンパク質（nucleotide-binding leucine-rich repeat immune receptors; NLRs）によって認識することで誘導される effector-triggered immunity（ETI）、さらには局所的な病原体感染によって全身レベルで誘導される全身獲得抵抗性（systemic acquired resistance; SAR）などのようなさまざまな免疫システムが分子レベルで理解されつつある。

しかし、本来、植物免疫は病原体を認識した植物細胞から始まり、その周辺細胞から組織、個体レベルへと様々な形で発展・展開していくものであり、上述の PTI, ETI, SAR に関しても、植物にとっては一連の応答の時空間的な変遷過程の特徴的な部分を定義したものに過ぎないと考えられる（図 1）。また、病原体に関しても、相互作用の過程において、自身の増殖を試みながらさまざまな形で病原力を発揮し、免疫を抑制しようとしていると考えられており、現象のみならず個体（細胞）数まで激しく変化する。このような時空間的ダイナミクスを内包する現象を正しく捉え、その分子機構を理解するにはライブイメージングが重要な手段となる。我々のグループでは、シロイヌナズナと *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) との相互作用系をモデルとして、植物免疫や細菌病原力の指標となるマーカー遺伝子のプロモーターレポーター株を用いることで両者の時空間的ダイナミクスを捉え、それらを司る分子機構を解析する研究を行ってきた。その過程で得られた各種の新知見を紹介する。

2. 過敏感反応

時空間的に制御されている植物免疫の例として、最もよく知られているものの一つが過敏感反応（Hypersensitive response; HR）である。HR は、植物側の抵抗性遺伝子が特異的に病原体エフェクターを認識した時に起きる局所的な植物細胞の自殺、すなわち過敏感細胞死（Hypersensitive cell death; HCD）を伴う強力な免疫応答のことであり、ETI に伴って見られることが多い（Balint-Kurti, 2019; Mur et al., 2008）。一般に、HCD は病原体が感染を試みた部位やそのごく周辺の細胞のみで見られ、また HR に伴う防御応答遺伝子発現も HCD 周辺に限って見られることから、病原体認識によって生じる何らかの極性を元に、時空間的に制御さ

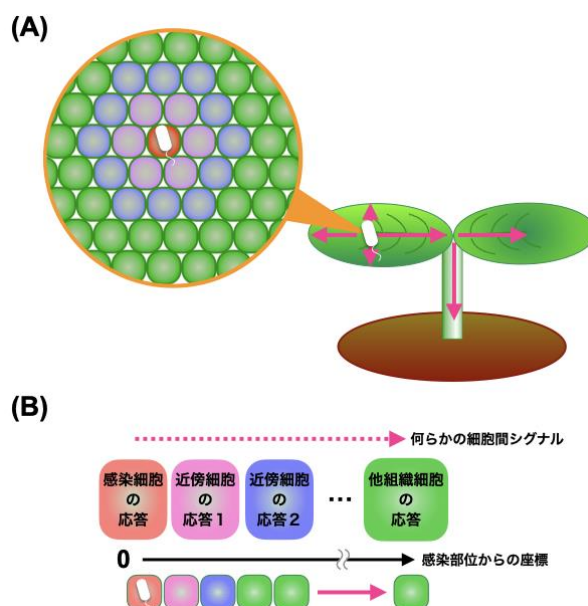


図1 植物免疫の時空間的制御モデルの概念図

(A) 病原体の局所的な感染により、感染細胞を中心にして非感染部位へと極性（細胞の色や矢印）が生じる。(B) 植物細胞は感染部位からの何らかのシグナルにより、距離に応じて異なる応答を示す。

れた防御応答であると考えられる (Kombrink and Somssich, 1995). また, HR 誘導においては植物ホルモンであるサリチル酸 (SA) が重要なシグナル分子として機能することが知られており, 感染部位で合成された SA がその周辺の非感染細胞に濃度勾配を形成することで, SA 濃度に依存して, 高濃度側から HCD, 防御遺伝子の発現, などが誘導されるというモデルが提唱されていた (Dorey et al., 1997; Enyedi et al., 1992; Yan and Dong, 2014). しかし, その一方で, HR 誘導時には SA と強い相互拮抗関係にあることが知られているジャスモン酸 (JA) が蓄積することや ETI 誘導に JA 機能が重要であることも報告されており, どのようにして一つの感染組織で互いに拮抗する SA および JA のシグナル経路が同時に活性化するのが不明であった (Kenton et al., 1999; Liu et al., 2016; Spoel et al., 2003; Tsuda et al., 2009).

そこで, 両ホルモンシグナル経路のマーカー遺伝子に関してプロモーターレポーターシロイヌナズナを作出した (Betsuyaku et al., 2018). さらに, 土に植えた植物を, 長時間に渡って蛍光タイムラプス撮影可能なイメージング系も新たに構築し, この系を用いて *AvrRpt2* を持つ *Pst* を感染させたシロイヌナズナ葉を 40 時間に渡って観察した (Betsuyaku et al., 2019, 2018). その結果, 感染領域周辺で SA シグナル経路活性を示す *Pathogenesis-Related Gene 1* プロモーター (*pPRI*) 活性が一過的に上昇し, その *pPRI* 活性化領域を取り囲むように JA シグナル経路活性を示す *Vegetative Storage Protein 1* プロモーター活性化領域が一過的に生じること, すなわち, 強い相互拮抗関係にある二つのホルモンシグナル経路が同一葉内の異なる部位で同時に活性化されていることを見出した (図 2, Betsuyaku et al., 2018). この発見は, 空間的側面を加味することで, 植物免疫という現象の理解が飛躍的に進むことを示唆するものでもあった.

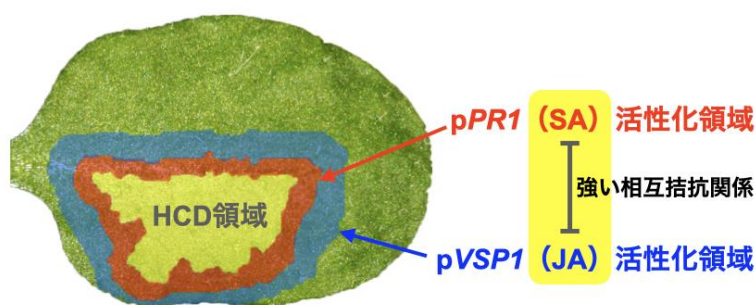


図2 HR 時に見られる SA 系および JA 系シグナル経路活性化領域の概略図
AvrRpt2 保有 *Pst* 株の高濃度注入接種による HR では, SA および JA 経路活性化を示すプロモーター活性が, 接種部; SA, 周辺部; JA という同心円状パターンとして HCD 領域周辺に現れる. (図は Betsuyaku et al., 2018 より改変)

3. 細菌感染におけるファイトアレキシンの役割

植物免疫における実行因子として, ファイトアレキシシがよく知られている (Ahuja et al., 2012). ファイトアレキシシとは, 病原体感染などのストレスによって植物が新たに合成・蓄積する低分子の抗菌性二次代謝化合物の総称であるが, それらの抗菌性に関する知見の多くは糸状菌病原体に対してのものであり, 植物病原細菌に対する作用に関してはあまりよくわかっていない (Ahuja et al., 2012). シロイヌナズナのファイトアレキシシであるカマレキシシ (CA) はその最たるものであり, CA 合成に必須なシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ CYP71B15 をコードする遺伝子 *Phytoalexin-Deficient 3* (*PAD3*) の欠損変異体において, *Pst* 増殖が野生型植物と変わらないことから, CA は *Pst* 感染抑制には寄与しないとされてきた (Glazebrook et al., 1997; Schuehberger et al., 2006). しかし, 近年, 病原性 *Pst* が *pad3* 植物において野生型よりもよく増殖するという報告や, *pad3* 植物においては *PAD3* の基質となる dihydrocamalexin acid (DHCA) が過剰に蓄積し, その DHCA 自体が *Pst* 増殖抑制活性を持つことから, *pad3* 植物を用いた CA の機能解析は不適当なのではないかという報告も

出ており、未だ混乱している (Kempthorne et al., 2021; Rajniak et al., 2015). そこで我々は、本件を検証する新しい切り口として *PAD3* プロモーター (*pPAD3*) の時空間的制御機構に興味を持ち、*pPAD3* レポーター植物を構築し、病原性 *Pst* を接種して解析を行なった。その結果、接種部位周辺で CA 合成に関わる *pPAD3* 活性の一過的上昇が見られるものの、接種領域内部では *Pst* の持つ III 型分泌機構 (T3SS) 依存的にその活性が強く抑制されることを見出した (別役ら, 発表準備中). 一方で、一般的な抵抗性マーカー遺伝子と考えられる *pPR1* 活性や、*PAD3* 遺伝子の発現制御に関わっている *WRKY33* プロモーター (*pWRKY33*) 活性は接種領域内部でも強い活性誘導が見られることから、*pPAD3* 活性特異的な現象であると考えられる (別役ら, 発表準備中). 質量分析イメージング技術も用いて、実際に接種領域内部では CA が蓄積しないことも見出した (別役ら, 発表準備中). さらに、CA が栄養条件依存的に強い *Pst* 増殖抑制活性を示すことから、そもそも *Pst* にとっては T3SS を介した CA 合成抑制が病原体化の鍵であった可能性を示唆している (別役ら, 発表準備中).

4. システミックな免疫応答

病原体感染に対する植物の免疫応答には様々な内生ペプチド性シグナル分子が関与している (Yamaguchi and Kawasaki, 2021). 植物のペプチドホルモンとしてよく知られているものの一つが、*CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED* (*CLE*) 遺伝子ファミリーである (Betsuyaku et al., 2011). シロイヌナズナゲノムには 32 コピーの *CLE* 遺伝子が存在するが、*CLAVATA3* (*CLV3*) に代表されるように、それらのほとんどはメリステム維持など、植物の形態形成において機能していることが知られている (Betsuyaku et al., 2011). しかし、シロイヌナズナの *CLE25* は乾燥耐性という非生物学的ストレス応答に関与し、さらにはミヤコグサの *LjCLE-RS1/RS2* が根粒菌との相互作用に関与していることも知られるようになり、*CLE* 遺伝子が病原微生物との相互作用に関与する可能性に興味を持たれた (図 3, Okamoto et al., 2013, 2009; Takahashi et al., 2018).

そこで、我々は、*CLE1-7* に着目して植物防御応答への関与を調査したところ、特に *CLE3* 発現がエリシターである *flg22* や *Pep2* 処理、さらには SA 処理によって強く誘導されることを見出した (図 3, Ma et al., 2022). また、*CLE3* 誘導発現は根部維管束特異的であり、SA 処理による *CLE3* 発現誘導は *NON-EXPRESSOR OF PR GENES 1* (*NPR1*) 依存的、*flg22* 処理による *CLE3* 発現誘導は *FLAGELLIN-SENSITIVE 2* (*FLS2*) および *NPR1* 依存的であった (Ma et al., 2022). さらに、土壌 SA 処理によって、地上部で *WRKY33* の発現が誘導されることを見出したが、*cle3* 変異体では *WRKY33* 発現上昇が有意に抑制され、根部特異的な *CLE3* 誘導発現が地上部 *WRKY33* 発現を誘導することも見出した (図 3, Ma et al., 2022).

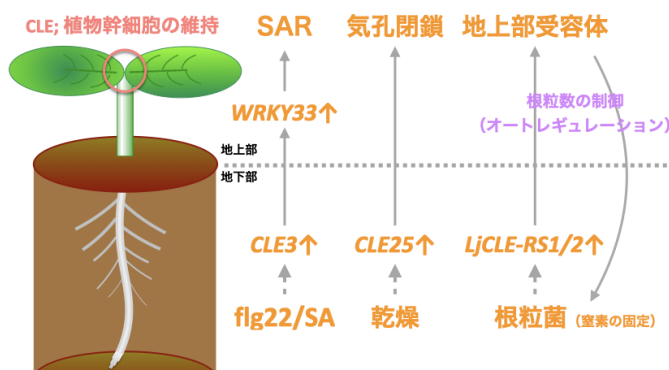


図3 微生物や非生物学的ストレスへの応答に関与する長距離 CLE シグナリング経路

幹細胞維持機構への関与がよく知られる CLE シグナリング経路であるが、微生物や乾燥ストレスに応答しての根部—地上部シグナリング機構に関わるものも存在する。

WRKY33 は SAR の制御因子としても知られており、以上の結果は、CLE3 ペプチドが根部から地上部への全身的な抵抗性誘導に関与していることを強く示唆している (図 3, Ma et al., 2022). さらに興味深いことに、長時間にわたるライブイメージング解析により、根部 SA 処理を行なった植物の地上部では、pWRKY33 活性化領域が動的に変遷することが見出され、現在、その現象を支配する分子機構の解析に取り組んでいる (別役ら, 未発表).

5. 免疫応答と細胞の「個性」

ここまで、よく知られた植物免疫の現象ではあるが、ライブイメージング技術を用いることで初めて見出されたこと、よく理解できるようになったことに関してそれらの概略を述べてきた。これらからわかることは、やはり植物免疫は病原体との相互作用の中で時空間的に制御されていることであり、そのことが環境中での植物の生存にとって重要なものであると考えられることである。植物にとっても、感染部位で感染抑制に必要な十分な防御応答を行うことや、その周辺、さらには全身的に二次感染に備えることは重要であるし、SA シグナル系の恒常的活性化変異体を見てもわかるように、免疫系が過剰に活性化しないメカニズムが存在することが容易に推察される。このように、感染部位からの距離に応じた免疫の制御というのは、おそらくは何らかの細胞間シグナル分子によってなされているものと考えられるが、SAR などの制御因子に比べ、例えば HCD 領域周辺などといった近距離で働くものは未だよくわかっていない。既知のものも含めて、今後の解析が待たれるところである。

このような細胞間相互作用に関して植物分野において理解が進んでいるのが、形態形成の分野である。この分野の特徴としては、当たり前ではあるが解剖学的知見が豊富で、組織構造、すなわち、表皮、内皮など各細胞種の種別と、組織内でそれら細胞が占める部位(座標)が明確であることである。そのため、細胞間相互作用解析にしても、細胞観察を重要な技術基盤として、注目する組織構造の中においての特定の細胞種同士のやり取りとしてさまざまな観点からの解析が行われてきた。逆に考えると、見てわかる明確な細胞の「個性」があるおかげで形態形成を支配する分子機構に対する理解が深まったとも言える。一方、植物免疫に関しては、(組織ごとの特性の違いはあるとしても)植物のどの部位でも起きる事象であり、明確な組織構造の中に落とし込んで一般化して理解することができない。感染が地上部表皮で起きた場合と、花卉表皮や根部表皮で起きた場合ではその応答も異なるであろうし、同じ葉組織の表皮でも、気孔近くや主脈付近とでは細胞形態が異なるために免疫応答の広がりも変わってくると考えられる。植物免疫においては、病原体と直面した細胞を原点として、それぞれの感染組織・構造に応じた防御応答を司る座標軸が形成されると推察される。近年、根部での植物-微生物相互作用の時空間的制御機構に関して、非常に興味深い新知見が繰り返し報告されているのも、根という解剖学的に明確な場の定義がなされた組織を用いた実験系を構築したおかげであるとも考えられる (Andersen et al., 2021; Cao et al., 2024; Emonet et al., 2021; Fröschel et al., 2021; Marhavý et al., 2019; Poncini et al., 2017; Wyrsh et al., 2015; Zhou et al., 2020).

根部以外の組織において、上述の課題を克服して、植物免疫の時空間的制御機構を理解する新たな技術として、single cell RNA-seq 技術を用いたトランスクリプトーム解析による各細胞の個性の特徴づけがある。多くの生物学分野が空間トランスクリプトーム解析に向かう中、植物病理学分野においても特徴的な挙動を示すマーカー遺伝子のプロモーターレ

ポーター植物と合わせて用いることで、*Pst* 感染に伴う植物免疫と植物の感受性に関わる遺伝子群の時空間的動態を明らかにするなど、今後ますますその発展が期待される分野である (Zhu et al., 2023). ただ、プロモーターレポーターという技術に依存する限りは、形質転換植物の作出や扱うことができる遺伝子数の制限といった技術面の限界に直面することが避けられない。この点を克服しつつ、single cell RNA-seq 解析で特徴づけられた多くの遺伝子の植物組織中での発現パターン解析を同じ組織サンプルで、しかも比較的安価に達成する新たな技術として PHYTOMap (plant hybridization-based targeted observation of gene expression map) が報告され、ETI を一細胞レベルで時空間的に記述することに成功している (Nobori et al., 2023b, 2023a). また、イメージング技術を用いずとも、トランスクリプトームデータ時間的動態を数理モデルによって詳細に解析することで感染局所とその周辺での細胞応答の記述に成功した研究も報告されている (Liu et al., 2024). これらは細胞内の mRNA 分子種により細胞の「個性」を特徴づけるという強力な手法であり、かつ、次世代シーケンサー (NGS) を用いる技術や、得られたデータの解析理論は日進月歩の勢いで進んでいることから、今後、ますますの発展が期待される分野である。明確な組織構造を持たない「植物免疫応答の場」を細胞レベルで理解する手法として、非常に強力な手段になると期待される。

6. 一細胞操作による摂動実験系

上述の空間トランスクリプトームなどを用いた植物免疫機構の解析は、植物免疫というシステムそのものの理解を促すことになると考えられる。システムの挙動を理解するためにはさまざまな摂動実験が行われるが、最も代表的なものが野生型と特定の遺伝子の欠損変異体や過剰発現個体との比較解析である。これらは遺伝学的解析の基本として最も重要なものであるが、遺伝子の欠損や過剰発現といった影響が全身的なものであるため、細胞間シグナル伝達システムの理解のための解析には不向きである。そのため細胞間相互作用解析には、ある生物に異なる生物の細胞種が混ざったキメラ生物を用いての解析が古くから用いられてきた (図 4, Frank and Chitwood, 2016). また、特徴的な発現パターンを示すプロモーターを用いた局所的もしくは誘導的な遺伝子発現系も、このような目的で用いられることが多い (図 4). しかし、キメラや部位特異的プロモーターの利用は、シグナル入力 of 厳密な ON/OFF 制御が難しいことや、薬剤誘導性プロモーターであれば、薬剤の細胞への浸透性や薬剤そのものの扱いが、摂動実験の精度に影響する (図 4).

植物免疫システムの時空間的な挙動を解析するためのモデル実験系としては、やはり最小の単位での解析が望ましい。ETI は病原体エフェクターを植物細胞内で発現させることで細胞自律的に誘導することができる (Wu et al., 2003). そこで我々は、一細胞レベルで病原体エフェクターを発現させて ETI を起動させることで最小単位での HR を誘導するモデル実験系を構築することを考えた。免疫に関係する多彩な遺伝資源が利用可能で、かつ、

我々自身も多数のプロモーターレポーター株を整備してきたシロイヌナズナを用いることで、一細胞での病原体認識がどのように免疫システムを作動させるのかを検証することが可能となる。キメラ植物や薬剤誘導性プロモーターの利用は、一細胞レベルでのシグナル ON・OFF 制御という条件を満たさず、一細胞

レベルで条件的に遺伝子発現を操作できる新たな実験系が必要となった (図 4)。そこで我々は、近年、オプトジェネティクス (光遺伝学) として隆盛を極めて光に注目した。オプトジェネティクスとは、特に動物分野において、植物由来の光受容体をさまざまに改変して動物細胞で発現させ、特定の波長を持つ光を一細胞などの局所に照射することにより、一細胞レベルで遺伝子発現をコントロールする技術のことである。ただ、それら光受容体の供給源となった植物では、内生のシグナル経路との混線のため、可視光を使ったオプトジェネティクス技術の利用は困難であった (図 4, Christie and Zurbriggen, 2021; Ochoa-Fernandez et al., 2020)。一方、顕微鏡視野下で標的一細胞に赤外レーザーを照射することができる IR-LEGO (Infrared laser-evoked gene operator) という装置が開発され、さまざまな動植物種において標的となる一細胞でヒートショックを誘導して熱応答性プロモーター制御下で目的の遺伝子発現を誘導する技術を確立していたため、我々のグループでは、この装置を用いて赤外光による一細胞遺伝子発現系を構築することを行なった (Deguchi et al., 2009; Kamei et al., 2009)。より特異的な熱誘導性プロモーター領域 (pHSP18.2v2) を見出し、ステロイドホルモン受容体 (GR) 融合型 CRE 組換え酵素と loxP 配列と組み合わせ、さらに、数多くの試行データからデータサイエンス的技法を用いて最適なレーザー出力値の予測できるようにしたことで、シロイヌナズナでの再現性の高い標的一細胞遺伝子発現誘導プロトコルを確立することに成功した (図 4, Tomoi et al., 2023)。この手法を用いることで、根の表皮細胞・皮層細胞・内皮細胞、葉の表皮細胞・葉肉細胞・孔辺細胞などといったさまざまな細胞種において、高い確率で狙った一細胞での遺伝子発現を誘導することに成功しており、現在、最小単位での HR 誘導系の構築を進めている (図 4, Tomoi et al., 2023)。またこの一細胞操作技術は、一細胞レベルでの条件的ノックアウト・ノックダウンや遺伝子編集等にも応用可能であり、さまざまな細胞間相互作用解析に利用可能な、新たな植物

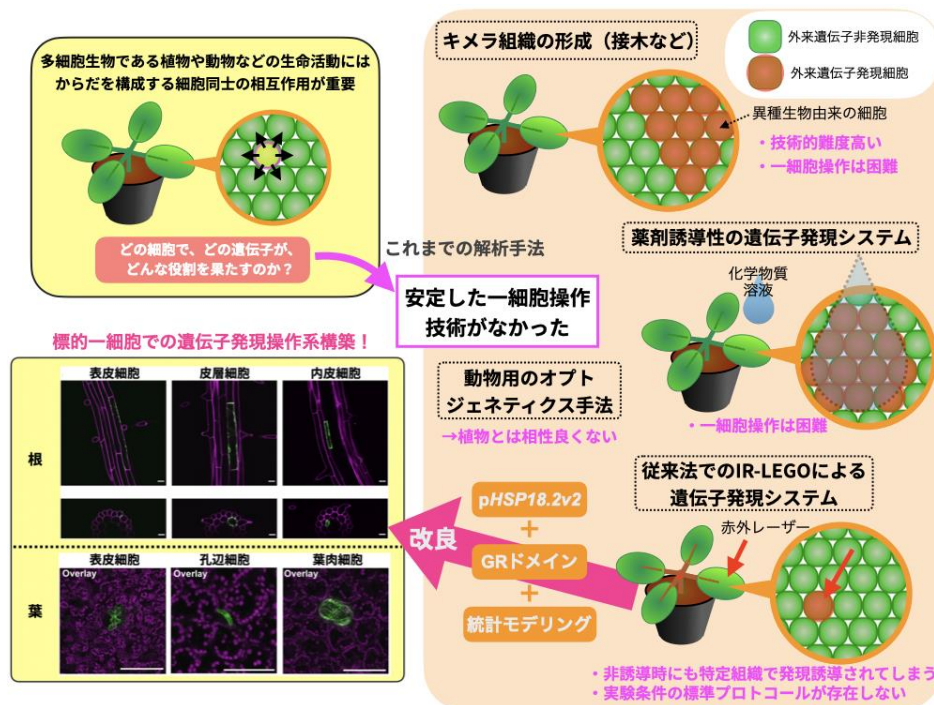


図4 植物での効果的な標的一細胞遺伝子発現操作系構築へと至る過程の概略

本文参照。(図は Tomoi, Tameshige et al., 2023 より改変)

のオプトジェネティクスのツールになると考えられる。

7. 最後に

本稿では、植物免疫の時空間的制御機構に関して、我々が行なってきた研究を軸に、分野における最近の進展を紹介した。HR やファイトアレキシン合成、SAR など、いずれも植物病理学分野ではよく知られた現象ではあるが、これら事象にでさえ、時空間的側面に着目することでまだまだ未知の興味深い生命現象が秘められていることを示しているとも言える。特に、NGS を基盤とした空間トランクリプトーム解析技術の発展は凄まじく、かつ、細胞の「個性」の記述手法として非常にパワフルであり、植物—微生物相互作用における時空間的側面からの現象の理解を大きく進めてくれるはずである。また、本稿では取り上げることができなかったが、病原体側の病原性因子の時空間的制御機構の理解も非常に重要である。特に、バイオフィームなどを形成し、感染中に膨大な数にまで増殖する細菌病原体に関してはそういった知見もあまりなく、我々のグループにおいても研究を進めている。また、本稿でも触れた多くの遺伝子のプロモーター活性は、レポーター植物を解析する限りは測定中にその活性化部位が動的に変動することも見出しており、こういった現象の制御機構を理解するためにも同一サンプルを用いた定点イメージング解析が重要であると考えられる。もちろん、レポーターを利用することによるアーティファクトである可能性もあるため、新たなレポーターの開発なども進めている。ライブイメージング技術と空間トランクリプトーム技術の融合により、植物—微生物相互作用の動態が鮮明に描き出される日が来ることが待ち遠しい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、論文共著者の皆様には多大な協力をいただいた。質量分析イメージングに関しては、(株)島津製作所の中川薫氏および奥田晃士氏の協力により行なった。これら成果の一部は、龍谷大学、筑波大学、東京大学での指導学生の成果でもある。ここに記して感謝の意を表する。また、数多くの共同研究者や友人諸氏との有意義な議論にも感謝申し上げる。本研究は、日本学術振興会(22880008, 23780040, 16K14750, 19H02954, 23K18034, 23H03844, 23H03847)、科学技術振興機構戦略的創造研究開発事業(さきがけ、ERATO、ALCA-next)、基礎生物学研究所(共同利用研究)、発酵研究所(一般研究助成)などの支援を受けて実施した。

引用文献

- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M. (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* 17: 73–90.
- Andersen, T.G., Molina, D., Kilian, J., Franke, R.B., Ragni, L., and Geldner, N. (2021) Tissue-Autonomous Phenylpropanoid Production Is Essential for Establishment of Root Barriers. *Curr Biol.* 31: 965-977.e5.

- Balint-Kurti, P. (2019) The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol.* 20: 1163–1178.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., and Fukuda, H. (2018) Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 59: 8–16.
- Betsuyaku, S., Nomura, N., and Fukuda, H. (2019) A Versatile Method for Mounting *Arabidopsis* Leaves for Intravital Time-lapse Imaging. *J Vis Exp.*
- Betsuyaku, S., Sawa, S., and Yamada, M. (2011) The Function of the CLE Peptides in Plant Development and Plant-Microbe Interactions. *Arabidopsis Book.* 2011: e0149.
- Cao, M., Platre, M.P., Tsai, H.-H., Zhang, L., Nobori, T., Armengot, L., et al. (2024) Spatial IMA1 regulation restricts root iron acquisition on MAMP perception. *Nature.* 625: 750–759.
- Christie, J.M., and Zurbriggen, M.D. (2021) Optogenetics in plants. *New Phytol.* 229: 3108–3115.
- Deguchi, T., Itoh, M., Urawa, H., Matsumoto, T., Nakayama, S., Kawasaki, T., et al. (2009) Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and *Arabidopsis thaliana*. *Dev Growth Differ.* 51: 769–775.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.-A., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffmann, S. (1997) Spatial and Temporal Induction of Cell Death, Defense Genes, and Accumulation of Salicylic Acid in Tobacco Leaves Reacting Hypersensitively to a Fungal Glycoprotein Elicitor. *Mol Plant-microbe Interactions.* 10: 646–655.
- Emonet, A., Zhou, F., Vacheron, J., Heiman, C.M., Tendon, V.D., Ma, K.-W., et al. (2021) Spatially Restricted Immune Responses Are Required for Maintaining Root Meristematic Activity upon Detection of Bacteria. *Curr Biol.* 31: 1012-1028.e7.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., and Raskin, I. (1992) Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc National Acad Sci.* 89: 2480–2484.
- Frank, M.H., and Chitwood, D.H. (2016) Plant chimeras: The good, the bad, and the ‘Bizzaria.’ *Dev Biol.* 419: 41–53.
- Fröschel, C., Komorek, J., Attard, A., Marsell, A., Lopez-Arboleda, W.A., Berre, J.L., et al. (2021) Plant roots employ cell-layer-specific programs to respond to pathogenic and beneficial microbes. *Cell Host Microbe.* 29: 299-310.e7.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., et al. (1997) Phytoalexin-Deficient Mutants of *Arabidopsis* Reveal That PAD4 Encodes a Regulatory Factor and That Four PAD Genes Contribute to Downy Mildew Resistance. *Genetics.* 146: 381–392.

- Kamei, Y., Suzuki, M., Watanabe, K., Fujimori, K., Kawasaki, T., Deguchi, T., et al. (2009) Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nat Methods*. 6: 79–81.
- Kempthorne, C.J., Nielsen, A.J., Wilson, D.C., McNulty, J., Cameron, R.K., and Liscombe, D.K. (2021) Metabolite profiling reveals a role for intercellular dihydrocamalexin acid in the response of mature *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*. 187: 112747.
- Kenton, P., Mur, L.A.J., Atzorn, R., Wasternack, C., and Draper, J. (1999) (–)-Jasmonic Acid Accumulation in Tobacco Hypersensitive Response Lesions. *Mol Plant-microbe Interactions*. 12: 74–78.
- Kombrink, E., and Somssich, I.E. (1995) Defense Responses of Plants to Pathogens. *Adv Bot Res*. 21: 1–34.
- Liu, L., Sonbol, F.-M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., et al. (2016) Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat Commun*. 7: 13099.
- Liu, X., Igarashi, D., Hillmer, R.A., Stoddard, T., Lu, Y., Tsuda, K., et al. (2024) Decomposition of dynamic transcriptomic responses during effector-triggered immunity reveals conserved responses in two distinct plant cell populations. *Plant Commun*. 100882.
- Ma, D., Endo, S., Betsuyaku, E., Fujiwara, T., Betsuyaku, S., and Fukuda, H. (2022) Root-specific CLE3 expression is required for WRKY33 activation in *Arabidopsis* shoots. *Plant Mol Biol*. 1–15.
- Marhavý, P., Kurenda, A., Siddique, S., Tendon, V.D., Zhou, F., Holbein, J., et al. (2019) Single-cell damage elicits regional, nematode-restricting ethylene responses in roots. *Embo J*. 38.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*. 59: 501–520.
- Nobori, T., Monell, A., Lee, T.A., Zhou, J., Nery, J., and Ecker, J.R. (2023a) Time-resolved single-cell and spatial gene regulatory atlas of plants under pathogen attack. *bioRxiv*. 2023.04.10.536170.
- Nobori, T., Oliva, M., Lister, R., and Ecker, J.R. (2023b) Multiplexed single-cell 3D spatial gene expression analysis in plant tissue using PHYTOmap. *Nat Plants*. 9: 1026–1033.
- Ochoa-Fernandez, R., Abel, N.B., Wieland, F.-G., Schlegel, J., Koch, L.-A., Miller, J.B., et al. (2020) Optogenetic control of gene expression in plants in the presence of ambient white light. *Nat Methods*. 17: 717–725.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., et al. (2009) Nod Factor/Nitrate-Induced CLE Genes that Drive HAR1-Mediated Systemic Regulation of Nodulation. *Plant Cell Physiol*. 50: 67–77.
- Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., and Kawaguchi, M. (2013) Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat Commun*. 4: 2191.

- Poncini, L., Wyrsh, I., Tendon, V.D., Vorley, T., Boller, T., Geldner, N., et al. (2017) In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *Plos One*. 12: e0185808.
- Rajniak, J., Barco, B., Clay, N.K., and Sattely, E.S. (2015) A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature*. 525: 376–379.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatoš, A., et al. (2006) CYP71B15 (PAD3) Catalyzes the Final Step in Camalexin Biosynthesis. *Plant Physiol*. 141: 1248–1254.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Pelt, J.A.V., Mueller, M.J., et al. (2003) NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell Online*. 15: 760–770.
- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., et al. (2018) A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*. 556: 235–238.
- Tomoi, T., Tameshige, T., Betsuyaku, E., Hamada, S., Sakamoto, J., Uchida, N., et al. (2023) Targeted single-cell gene induction by optimizing the dually regulated CRE/loxP system by a newly defined heat-shock promoter and the steroid hormone in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 14: 1171531.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F. (2009) Network Properties of Robust Immunity in Plants. *Plos Genet*. 5: e1000772.
- Wu, Y., Wood, M.D., Tao, Y., and Katagiri, F. (2003) Direct delivery of bacterial avirulence proteins into resistant *Arabidopsis* protoplasts leads to hypersensitive cell death. *Plant J*. 33: 131–137.
- Wyrsh, I., Domínguez-Ferreras, A., Geldner, N., and Boller, T. (2015) Tissue-specific FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) expression in roots restores immune responses in *Arabidopsis fls2* mutants. *New Phytol*. 206: 774–784.
- Yamaguchi, K., and Kawasaki, T. (2021) Pathogen- and plant-derived peptides trigger plant immunity. *Peptides*. 144: 170611.
- Yan, S., and Dong, X. (2014) Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr Opin Plant Biol*. 20: 64–68.
- Zhou, F., Emonet, A., Tendon, V.D., Marhavy, P., Wu, D., Lahaye, T., et al. (2020) Co-incidence of Damage and Microbial Patterns Controls Localized Immune Responses in Roots. *Cell*. 180: 440–453.e18.
- Zhu, J., Lolle, S., Tang, A., Guel, B., Kvitko, B., Cole, B., et al. (2023) Single-cell profiling of *Arabidopsis* leaves to *Pseudomonas syringae* infection. *Cell Rep*. 42: 112676.

土壤伝染性フザリウム病の発病機構と土壌診断への応用

浅井 秀太*・鮎川 侑**・有江 力***・白須 賢*

Asai, S., Ayukawa, Y., Arie, T., and Shirasu, K.

Mechanism of pathogenesis of soilborne Fusarium wilt and its application to soil diagnosis

Abstract

Plant disease results only if all of three essential factors (susceptible host plant, pathogen, and favorable environment for disease) occur simultaneously. Certain pathogens can infect only specific plant species, so-called host specificity. Therefore, soilborne disease can be avoided if the host specificity of pathogens living in the planting soil can be specified. *Fusarium oxysporum* species complex consists of ubiquitous soil inhabiting fungi that can infect and cause disease in over 100 different plant species, which has been classified into more than 100 pathogenic forms (*forma specialis*; f. sp.). Since mechanisms for determining host specificity in *F. oxysporum* are largely unknown, it is difficult to evaluate which pathogenic forms of *F. oxysporum* inhabit the soil. Here, we report the results of research into development of soil diagnostics to specify *F. oxysporum* pathogenic forms living in the soil and mechanisms for determining infection establishment and host specificity of *F. oxysporum*.

Key words: *Fusarium oxysporum*, host specificity, soil diagnostics, genomics

*国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究センター Center for Sustainable Resource Science, RIKEN Yokohama Institute, Yokohama, Kanagawa 230-0045, JAPAN (*Corresponding author: shuta.asai@riken.jp)

**愛媛大学大学院 農学研究科 Department of Agriculture, Ehime University, Matsuyama, Ehime 790-8566, JAPAN

***東京農工大学大学院 農学研究院 農学部応用生物科学科 Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), Fuchu, Tokyo 183-8509, JAPAN

1. はじめに

近年の世界的な異常気象は国内外問わず食糧生産に大きな影響を及ぼしている。さらに、発展途上国を中心とした人口増加により食糧需要の拡大が懸念され、安定した食糧生産は人類にとって大きな課題となっている。このような食糧事情の中で、農作物の生産損失として大きな割合を占めているのが病害である。特に、土壌伝染性の病害の被害は、当分のみに止まらず、時間的に拡大するところに大きな問題が潜んでいる。すなわち、連作による病原体の蓄積による時系列的な被害の増大によって、産地壊滅の危機となったケースも多々ある。作付けを行う土壌における病害の発生予察（土壌診断）が可能になれば、被害を最小限に抑えることができる。また、病原菌が持つ感染に必要な因子、およびその発病機構を明らかにすることができれば、新奇の病害防除法へとつながることが期待される。

病害は、病気にかかる体質をもつ植物、これを侵すことができる病原菌、ならびに病気の発生に必要な環境条件がそろったときにのみ発生する。つまり、宿主植物、病原菌、環境条件の3つの要因のかかり具合によって、病気の発生の時期や程度が左右され、最終的な被害が決まる。病害発生の有無を決定する最も大きな要因は、植物と病原菌の組み合わせである。特定の病原菌は、特定の植物種にのみ感染して発病させることができ、それを「宿主特異性」と呼ぶ。例えば、世界中で重大な土壌病害を引き起こしている糸状菌フザリウム (*Fusarium oxysporum*) には、100以上の分化型 (*forma specialis*; f. sp.) が存在し、それぞれ異なる植物種に感染する宿主特異性が見られる。しかし、分化型の宿主特異性決定機構についてはほとんどわかっていないため、分化型解析マーカーなどが整備されておらず、土壌中に生息する病原性フザリウム分化型の評価ができない。通常、真核生物では、染色体の数や構造は種内で保存的かつ安定であると考えられているが、フザリウムを含む菌類では、生育や生命活動（一次的機能）に必須でないが、保持／不保持によって、病原性や毒素生産等の二次的機能決定に関わる染色体あるいは染色体領域を持つ場合があることが明らかになってきた。生育や生命活動に必須な「コア染色体」に対して、このような染色体を「アクセサリー染色体」と呼ぶ。これまでの研究で、トマト萎凋病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Ma et al. 2010)、キュウリ根腐る割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (van Dam et al. 2017)、キャベツ萎黄病菌 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Ayukawa et al. 2021) からは、病原性および宿主特異性の決定を司るアクセサリー染色体が見出されている。これらの菌では、アクセサリー染色体喪失株を作出すると、生育・生存には影響が無いが、病原性の喪失や低下を引き起こす。近年、ゲノム解析を通して、アクセサリー染色体領域の特徴が明らかになってきた。トマト萎凋病菌とキャベツ萎黄病菌の比較解析では、それぞれのアクセサリー染色体領域は、相同性が見られず、転移因子が多く見られる (図1)。つまり、宿主を異とする

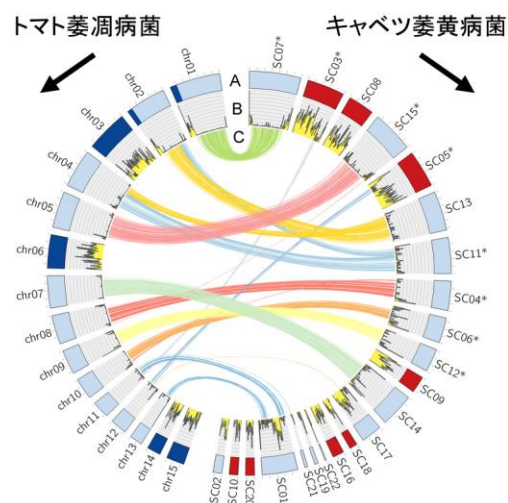


図.1 トマト萎凋病菌とキャベツ萎黄病菌の比較ゲノム解析
A 青色: トマト萎凋病菌のアクセサリー染色体領域
赤色: キャベツ萎黄病菌にて喪失が確認された染色体領域
B 転移因子の分布状況
C シンテニー領域 (95% identity, 30 kb)
(Ayukawa et al. 2021を改変)

フザリウム分化型は、それぞれ独自のアクセサリ染色体領域（分化型特異的ゲノム領域）を持っており、それにより宿主特異性が決定されていることが伺える。つまり、フザリウムの異なる分化型間で比較ゲノム解析を行い、それぞれの分化型特異的ゲノム領域を明らかにできれば、分化型解析マーカーが構築できると考えられる。また、分化型特異的ゲノム領域に座乗する病原性因子は、宿主特異性（感染の成否）を決定する因子であると考えられる。

本稿では、土壌中に生息する病原性フザリウムの分化型を特定する「土壌診断法の開発」および「フザリウム菌の寄生成立・宿主特異性決定機構」の解明に向けたこれまでの研究成果について紹介する。

2. 土壌診断法の開発

ヒトの腸内マイクロバイオータに善玉菌と悪玉菌があるように、同属（および同種）の菌であっても植物病原菌として振る舞う菌（病原型）もいれば、植物に利益をもたらす菌（共生型）もいる。研究対象とするフザリウムにおいても、健康な植物の根圏から頻繁に検出される上に、非病原性のフザリウムを根に処理しておく、フザリウム病（萎凋病）の発病を抑制する場合があります、その機構については未詳であるが、生物防除素材として実際に利用されている（勝部ら, 1997; 小川ら, 2007）。つまり、病原となりうる微生物の存在を正確に検出する必要があり、土壌中に存在する病原性フザリウム分化型の同定を可能にする土壌診断法の開発を目指している。

フザリウムは、宿主を異とするそれぞれの分化型特異的ゲノム領域を持っており、それにより宿主特異性が決定していると考えられている。そのため、異なる分化型間での比較ゲノム解析を行う上で、ゲノム配列が明らかとされているトマト萎凋病菌をリファレンスとした場合、重要な分化型特異的ゲノム領域の情報を見落とす可能性がある。そこで、ロングリード PacBio シーケンサーを用いて、対象とするそれぞれの分化型毎に *de novo* アセンブリを行い、全ゲノム配列を明らかにした後に、比較ゲノム解析を行うことで分化型特異的ゲノム領域を明らかにするアプローチを取っている。これまでに、先行的に解析を進めてきた 11 菌株に、ゲノムが公開されていた 4 菌株を加えた計 15 菌株における比較ゲノム解析により、それぞれの分化型特異的ゲノム領域候補を明らかにした。また、その情報を基に分化型解析マーカーを構築し、土壌中の一部の病原性フザリウム分化型を特定する手法を確立した（特許出願済）。

3. フザリウム菌の寄生成立・宿主特異性決定機構

上述の土壌診断手法は、ゲノム情報のみに基づいた分化型特異的検出手法となっており、宿主特異性決定機構との紐づけがされていないため、特異的検出の正確性、信頼性、持続可能性について危惧される。そこで、宿主への寄生成立に関わる因子を同定することで、宿主特異性決定機構と紐づけされた土壌診断法の確立を目指している。

3-1. キャベツ萎黄病菌の宿主決定に関わるペアエフェクターの同定

キャベツおよびモデル植物であるシロイヌナズナに感染することができるキャベツ萎黄病菌をモデル菌株として、その宿主特異性決定機構の解明を試みた。PacBio シーケンスおよびオプティカルマッピングにより、22 本のスキューホールで構成される、68.8 Mb の

キャベツ萎黄病菌の全ゲノムマップを得た。ゲノム情報が既知のトマト萎凋病菌との比較ゲノム解析を行い、キャベツ萎黄病菌に特有のゲノム塩基配列で構成される染色体 (SC : scaffold) を複数本特定した (図 1)。

これまでにトマト萎凋病菌から、培地上での生育に関与せず、宿主のトマトへの病原性に必要なアクセサリ染色体 (病原性染色体) が特定されている (Ma *et al.* 2010)。病原性染色体は生育には必須でないため、病原性染色体を失った菌株は培地上で培養できるが、病原性は失われる。そこで、キャベツ萎黄病菌に特有の染色体が病原性染色体であるか調査するため、キャベツ萎黄病菌において、細胞分裂時に紡錘糸形成を阻害する薬剤 (ベノミル) を処理することで、染色体喪失株を人為的に作出した。染色体喪失株のゲノム解析の結果、変異株ごとに染色体の喪失パターンが異なること、ならびに喪失が確認された染色体は全てキャベツ萎黄病菌に特有な染色体であることが明らかになった (図 1)。

これらの変異株の病原性を調査したところ、シロイヌナズナへの病原性だけを喪失した変異株 (HS5)、シロイヌナズナおよびキャベツ双方への病原性を喪失した変異株 (HS6) が認められた (図 2)。病原性の変化と染色体喪失パターンを照らし合わせることで、シロイヌナズナへの病原性に必要な病原性染色体 1 (SC10、SC20) およびキャベツへの病原性に必要な病原性染色体 2 (SC05、SC08) を特定した (図 2)。

シロイヌナズナやキャベツなどのアブラナ科植物は、アミノ酸であるトリプトファン由来の生体防御物質を生合成することが知られている (Bednarek 2012; Rajniak *et al.* 2015)。そこで、キャベツ萎黄病菌の病原性染色体がトリプトファン由来の生体防御物質を介したシロイヌナズナの免疫を抑制するか確認するために、トリプトファン由来の二次代謝産物の生合成変異シロイヌナズナ (*cyp79b2/cyp79b3* 二重変異体) に対する HS5 変異株 (Δ SC10/SC20) の病原性を調査した。その結果、HS5 変異株 (Δ SC10/SC20) は、シロイヌナズナの野生型には病原性を示さないのに対して、*cyp79b2/cyp79b3* 二重変異体に対しては病原性を示した (図 3)。トリプトファン由来の生体防御物質は多様性に富んでおり、アブラナ科植物間でも生合成される抗菌物質は異なる。例えば、トリプトファン由来の抗菌物質であるカマレキシンはシロイヌナズナで生合成されるが、キャベツでは生合成されない (Sigareva *et al.* 1999)。そこで、カマレキシン生合成変異シロイヌナズナ (*pad3* 変異体) とカマレキシン以外の一部のトリプトファン由来生体防御物質の生合成変異体 (*pen2* 変異体および *cyp82c2* 変異体) に対する病原性を調べたところ、HS5 変異株 (Δ SC10/SC20) は *pad3* 変異体に対して病原性を示すことが分かった (図 3)。このことから、病原性染色体 1 (SC10、SC20) はシロイヌナズナ特有の抗菌物質を介する免疫の抑制に関与することが示された。

		キャベツ萎黄病菌		
		野生株	HS5	HS6
SC10/SC20	+	+	-	-
SC05/SC08	+	+	+	-

シロイヌナズナ			
キャベツ			

図.2 キャベツ萎黄病菌の病原性染色体の特定

病原性染色体1 (SC10、SC20) を失った変異株 (HS5) はシロイヌナズナに対する病原性が低下し、病原性染色体1および2 (SC05、SC08) を失った変異株 (HS6) はシロイヌナズナおよびキャベツ双方への病原性が低下した。
(Ayukawa *et al.* 2021を改変)

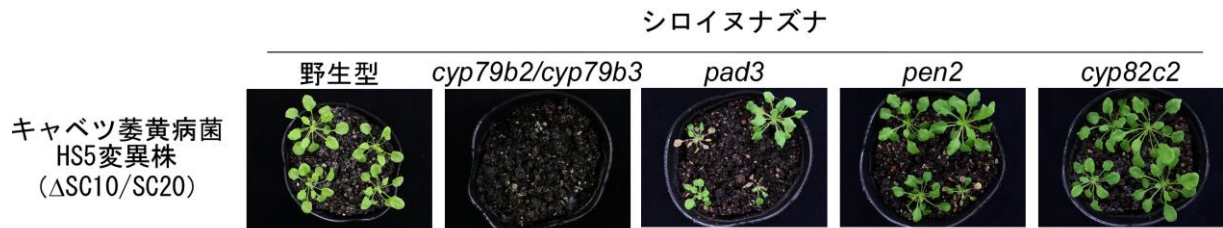


図3 トリプトファン由来の生体防御物質に依存する免疫の抑制に関与する病原性染色体1 (SC10、SC20)

キャベツ萎黄病菌HS5変異株 (Δ SC10/SC20) はシロイヌナズナ野生型に対する病原性が低下するが、トリプトファン由来の二次代謝産物の生合成変異シロイヌナズナ (*cyp79b2/cyp79b3* 二重変異体) に対して高い病原性を示した。トリプトファン由来の抗菌物質であるカマレキシンの生合成変異体 (*pad3* 変異体) に対しては中程度の病原性を示し、その他の抗菌物質変異体 (*pen2* 変異体および *cyp82c2* 変異体) に対する病原性は低下したままであった。(Ayukawa *et al.* 2021を改変)

次に、キャベツ萎黄病菌の病原性染色体1 (SC10、SC20) から、シロイヌナズナ特有の免疫機構の抑制に関与する病原性因子を特定するために、シロイヌナズナ感染時の遺伝子発現パターンを調べた。その結果、病原性染色体1 (SC10、SC20) の塩基配列上で隣り合って座乗する二つの遺伝子 (*SIX8* および *PSE1*) が、シロイヌナズナ感染時に強く発現誘導されることを見出した (図 4A)。そこで、この二つの遺伝子を含むゲノム領域 (*SIX8-PSE1*) をキャベツ萎黄病菌 HS5 変異株 (Δ SC10/SC20) に導入したところ、シロイヌナズナへの病原性が復帰した (図 4C)。一方、*SIX8* 単独、*PSE1* 単独で導入した HS5 形質転換株においては、病原性の復帰が観察されなかった。このことから、*SIX8* と *PSE1* は一緒に (ペア遺伝子として) 機能することで、シロイヌナズナ特有の抗菌物質カマレキシンを介する免疫の抑制に関与すると考えられた。

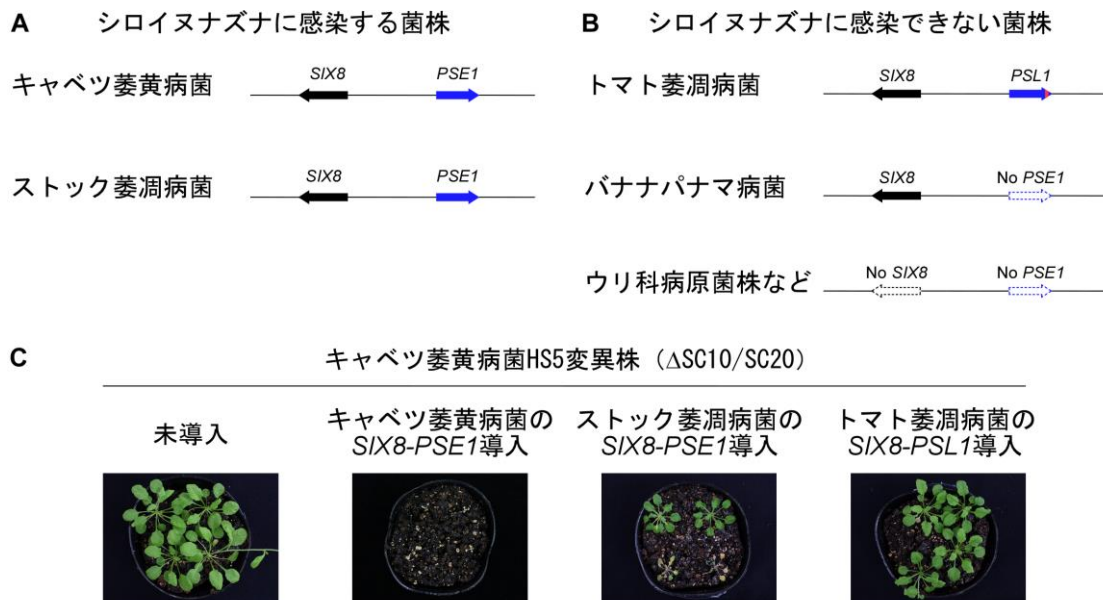


図4 病原性染色体1 (SC10、SC20) に座乗する二つの病原性遺伝子の遺伝的および機能的な保存性

- A シロイヌナズナに感染する菌株 (キャベツ萎黄病菌、ストック萎凋病菌) 間では、*SIX8-PSE1* 遺伝子領域は保存されていた。
- B シロイヌナズナに感染しない菌株間では、*SIX8-PSE1* 遺伝子領域に変異が存在 (トマト萎凋病菌)、または *SIX8-PSE1* 遺伝子領域が保存されていない (バナナパナマ病菌、ウリ科病原菌株など)。トマト萎凋病菌の赤色の部分は、キャベツ萎黄病菌 *PSE1* と比較して挿入が確認された10個のアミノ酸を示す。
- C キャベツ萎黄病菌およびストック萎凋病菌由来の *SIX8-PSE1* 遺伝子領域の導入によって、キャベツ萎黄病菌HS5変異株 (Δ SC10/SC20) の病原性が復帰したが、トマト萎凋病菌由来の *SIX8-PSL1* 遺伝子領域の導入では復帰しなかった。(Ayukawa *et al.* 2021を改変)

次に、*SIX8* と *PSE1* が他のフザリウム菌株にも保存されているか調査したところ、シロイヌナズナに感染できる菌株、例えばストック萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *matthiolae*) には、*SIX8* と *PSE1* それぞれ相同性の高い遺伝子が保存されていることが分かった (図 4A)。一方で、シロイヌナズナに感染しないトマト萎凋病菌は、*SIX8* 相同遺伝子の近傍に、キャベツ萎黄病菌 *PSE1* と比較して、10 個のアミノ酸の挿入が見られる *PSE1* 類似遺伝子 (*PSL1*) が見出された (図 4B)。また、バナナパナマ病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) TR4 株では *SIX8* 相同遺伝子のみが保存されており、ウリ科植物に感染する菌株などでは、*SIX8* と *PSE1* どちらの遺伝子も保存されていなかった (図 4B)。続いて、上記 *SIX8-PSE1* 相同遺伝子がシロイヌナズナへの病原性に関与するか調査するために、キャベツ萎黄病菌 HS5 変異株 (Δ SC10/SC20) に相同遺伝子を導入した。その結果、ストック萎凋病菌由来の相同遺伝子を導入した株では、シロイヌナズナへの病原性が復帰したが、トマト萎凋病菌由来の相同遺伝子を導入した株では、病原性が復帰しなかった (図 4C)。これらの結果から、*SIX8-PSE1* ペア遺伝子がシロイヌナズナに感染する菌株間で、遺伝的かつ機能的に保存されている可能性が示された (Ayukawa *et al.* 2021)。また、以上のことから、キャベツ萎黄病菌は *SIX8-PSE1* ペア遺伝子によって、シロイヌナズナ特有の免疫機構を抑制し、感染を成立させていると考えられる。

3-2. *SIX8-PSE1* ペアエフェクターはハウレンソウ萎凋病菌の病原性に関与する

上述の通り、キャベツ萎黄病菌における分子遺伝学的解析により、病原性染色体に隣接して座乗する *SIX8-PSE1* ペアエフェクターが、シロイヌナズナへの病原性に必要であること、およびシロイヌナズナへの感染能力を持つフザリウム菌株において保存されていることを明らかにしてきた (Ayukawa *et al.* 2021)。ゲノム解析の結果、例外的に、ハウレンソウ萎凋病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *spinaciae*) は、シロイヌナズナへ病原性を示さないにも関わらず *SIX8-PSE1* ペアエフェクター相同遺伝子を保持していること、ならびにダイコン萎黄病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *raphani*) およびカブ萎黄病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *rapae*) は、シロイヌナズナへの感染能力を持つにも関わらず、*SIX8-PSE1* ペアエフェクターを保持していないことがわかった。

ハウレンソウ萎凋病菌において、*SIX8-PSE1* ペアエフェクター相同遺伝子が病原性に関与するかについて明らかにするため、キャベツ萎黄病菌と同様にベノミル処理により染色体異常を誘導し、*SIX8* 遺伝子を喪失した変異株のスクリーニングを実施した。その結果、*SIX8-PSE1* ペアエフェクター相同遺伝子が座乗する染色体のみが喪失した株 (B48) を見出し、B48 変異株が宿主ハウレンソウへの病原性が低下していることを明らかにした。続いて、ハウレンソウ萎凋病菌由来の *SIX8-PSE1* ペアエフェクター (*FospSIX8-PSE1*) を形質転換したところ、一部病原性が復帰する一方、*FospSIX8* 単独、*FospPSE1* 単独を形質転換しても病原性の復帰は観察されなかった。また、*FospSIX8-PSE1* 破壊株は、野生型と比べて病原性の低下が観察された。以上のことから、ハウレンソウ萎凋病菌においても *SIX8-PSE1* はペアで機能し、病原性に寄与することが示唆された。

3-3. ダイコン萎黄病菌の病原性に関わる新たなペアエフェクターの同定

ダイコン萎黄病菌は、*de novo* ゲノムシーケンスの結果、計 22 contigs からなるゲノムアセンブリを得ており、シロイヌナズナへの感染能力を持つにも関わらず、*SIX8-PSE1* ペア

エフェクターを保持していないことがわかっている。そこで、ダイコン萎黄病菌における病原性染色体および病原性因子を明らかにするために、ベノミル処理により染色体異常を誘導し、それぞれの *contigs* に作製したマーカーを用いて染色体喪失株の網羅的なスクリーニングを実施した。その結果、様々なパターンで染色体を喪失した株を見出した。得られた染色体喪失株にて、宿主であるダイコンへの病原性および培地上でも栄養成長の様子を調べたところ、*contigs11/21*、*contig13*、*contig19* が宿主ダイコンへの病原性に、ならびに *contig2* が培地上での菌糸伸長に関与することが示唆された。*contig19* には 4 つのエフェクター候補遺伝子が座乗しており、内 2 つはプロモーター領域を共有し、宿主への感染時に強く発現誘導されることを見出した。そこで、2 つを同時に、またはそれぞれ単独で遺伝子破壊を行ったところ、どの破壊株も *contig19* 喪失株と同様に、宿主ダイコンへの病原性の低下が観察された。この結果より、同定したエフェクターがペアで機能することにより、ダイコン萎黄病菌の病原性に貢献することが示唆された。

3-4. カブ萎黄病菌の病原性に関わる新たなペアエフェクターの同定

カブ萎黄病菌は、*de novo* ゲノムシーケンスの結果、計 25 *contigs* からなるゲノムアセンブリを得ており (Asai *et al.* 2021)、シロイヌナズナへの感染能力を持つにも関わらず、*SIX8-PSE1* ペアエフェクターを保持していないことがわかっている。そこで、カブ萎黄病菌における病原性染色体および病原性因子を明らかにするために、上記ダイコン萎黄病菌と同様に、それぞれの *contigs* にマーカーを作製し、染色体喪失株の網羅的なスクリーニングを実施した。その結果、様々なパターンで染色体を喪失した株を見出し、その中で複数の染色体を喪失した株においては、顕著に宿主カブへの病原性が低下した。すなわち、カブ萎黄病菌の病原性に関わる染色体候補を見出した。並行して、*in silico* 解析により、*contig15* には多くのエフェクター様遺伝子が座乗していること、またその中には、ペアエフェクター様に隣接して座乗し、宿主カブへの感染時に発現が誘導される二つのエフェクター候補遺伝子を見出した。そこで、両遺伝子破壊株およびそれぞれ単独破壊株を作出したところ、いずれの変異体も、野生型と比べて宿主カブへの病原性の低下が観察された。以上のことから、カブ萎黄病菌において、新たなペアエフェクターを見出した。

4. 最後に

近年のシーケンス技術の発展に伴い、土壤環境中に存在する微生物種の特定までは可能となっているが、どの作物に対して病原となり得るのかについては評価できないのが現状である。そこで、現在の解析技術では調べることができない土壤微生物の病原性という情報を利用した土壤病害の発生予察（土壤診断）を可能にする技術基盤開発を目標としている。宿主特異性の決定因子を明らかにし解析マーカーとする、すなわち宿主特異性決定機構と紐づけされた土壤診断法は正確かつ永続的に利用可能であると期待している。

興味深いことに、ペアで機能するエフェクターがフザリウム菌の宿主への寄生成立に重要な役割を果たす病原性因子として同定されてきた。今後、どのように病原性に寄与しているのか、どのように獲得したのか、ペアである意味は？など未解明の謎を明らかにしていく。並行して、網羅的な比較ゲノム解析により、フザリウム分化型間で共通なコアゲノムに、分化型特異的ゲノム領域を加えたパンゲノムを明らかにすることで、病原性獲得および宿主決定機構、すなわち病原菌誕生の進化プロセスに迫ると共に、その知見が圃場現

場での病害防除に繋がることを期待している。

謝辞

本研究は、JST 創発的研究支援事業 JPMJFR2101、JST さきがけ JPMJPR16O1、および日本学術振興会科学研究費補助金（19H00939、23H00331）の支援を受けて実施した。

引用文献

- Asai S, Ayukawa Y, Gan P, Shirasu K (2021) Draft Genome Resources for Brassicaceae Pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae*. Mol Plant Microbe Interact 34: 1316-1319.
- Ayukawa Y, Asai S, Gan P, Tsushima A, Ichihashi Y, Shibata A, Komatsu K, Houterman PM, Rep M, Shirasu K, Arie T (2021) A pair of effectors encoded on a conditionally dispensable chromosome of *Fusarium oxysporum* suppress host-specific immunity. Commun Biol 4: 707.
- Bednarek P (2012) Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity. Chembiochem 13: 1846-59.
- Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim WB, Woloshuk C, Xie X, Xu JR, Antoniw J, Baker SE, Bluhm BH, Breakspear A et al. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. Nature 464: 367-373.
- Rajniak J, Barco B, Clay NK, Sattely ES (2015) A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. Nature 525: 376-9.
- Sigareva MA, Earle ED (1999) Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. Theor Appl Genet 98: 164-170.
- van Dam P, Fokkens L, Ayukawa Y, van der Graft M, Ter Horst A, Brankovics B, Houterman PM, Arie T, Rep M (2017) A mobile pathogenicity chromosome in *Fusarium oxysporum* for infection of multiple cucurbit species. Sci Rep 7: 9042.
- 小川潤子・渡邊健 “非病原性フザリウム菌を用いたシクラメン萎凋病の生物防除” 関東東山病害虫研究会報, 54: 77-80, 2007.
- 勝部和則・赤坂安盛 “非病原性 *Fusarium oxysporum* 利用によるハウレンソウ萎ちょう病の防除” 日植病報, 63: 389-394, 1997.

植物が病原菌由来の分子を認識するしくみ

加藤 大明^{*}・竹本 大吾^{**}・寺内 良平^{***}

Kato, H., Takemoto, D. and Terauchi, R.

Recognition of Pathogen-associated molecular patterns by plant

Abstract

Plants recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to activate PAMP-triggered immunity (PTI). However, our knowledge of PTI signaling remains limited. In order to clarify the unknown parts of plant PTI, we developed Lumi-Map, a high-throughput platform for identifying causative single nucleotide polymorphisms (SNPs) to study PTI signaling components. Then, we applied Lumi-Map to identify *Arabidopsis* PTI components involved in the perception of a novel PAMP, Pi-Cer D from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. Pi-Cer D is cleaved by an *Arabidopsis* apoplastic ceramidase, NEUTRAL CERAMIDASE 2 (NCER2), and the resulting 9-methyl-branched sphingoid base is recognized by a plasma membrane lectin receptor-like kinase, RESISTANT TO DFPM-INHIBITION OF ABSCISIC ACID SIGNALING 2 (RDA2). Thus, we have elucidated the two-steps recognition mechanisms of pathogen-derived lipid molecules in plants. This result suggests Lumi-Map as a potentially powerful platform to identify novel PRR-encoding genes and their downstream signaling genes using various PAMPs or microbial extracts as input signals.

Key words: PAMPs, PRR, Sphingolipids, ceramidase, Lumi-Map

^{*} 京都大学大学院農学研究科 栽培植物起原学分野 Graduate School of Agriculture, Kyoto University (corresponding author: kato.hiroaki.6a@kyoto-u.ac.jp)

^{**} 名古屋大学大学院生命農学研究科 植物病理学研究室 Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

^{***} 岩手生物工学研究センター Iwate Biotechnology Research Center

1. はじめに

植物は微生物を構成する分子パターン(Microbe/Pathogen-associated molecular patterns; MAMPs/PAMPs)を認識し、パターン誘導性免疫(Pattern-Triggered immunity; PTI)と総称される抵抗反応を誘導し、身を守っている。植物に感染できる微生物(植物病原菌)は、PTIなどの植物の抵抗反応を抑制する機能を持つエフェクターと呼ばれる分子を植物に作用させることにより感染を成立させる。一部の病原菌エフェクターは植物の抵抗性タンパク質(Nucleotide-binding domain Leucine-rich repeat containing Receptor; NLR)により認識され、これにより植物はより強い抵抗反応である Effector-Triggered Immunity (ETI)を誘導する。このように植物と微生物(植物病原菌)の間には種の存続を賭けた生存競争が現在まで継続されてきたと考えられる(Jones and Dangl, 2006; Ngou *et al.*, 2022).

植物の PTI は、細胞膜に局在する受容体(Pattern-recognizing receptor; PRR)の細胞外ドメインが対応する PAMP を認識することにより起動する(Ngou *et al.*, 2022; Bender and Zipfel, 2023). これまでに、微生物に由来するタンパク質やその分解産物であるペプチド、細胞壁などを構成する様々な糖、細胞膜や細胞外小胞を構成する脂質などが PAMPs として報告されてきた(Koga *et al.*, 1998; Umemura *et al.*, 2000; Shibuya and Minami, 2001; Zipfel *et al.*, 2006; Boller and Felix, 2009; Fesel and Zuccaro, 2016). 加えて、植物は PRR を介して、損傷した組織や感染した組織から放出される Damage-associated molecular patterns (DAMPs)や phytochemicals を認識し、病原体に対する防御応答を増幅あるいは調節する(Yamaguchi *et al.*, 2006; de Azevedo Souza *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2021). 病原菌を含む微生物や感染を受けた植物が生成する分子は数多く存在するが、どの分子(あるいは分子群)が PAMP や DAMP として植物により認識されているのか?、その全貌は未解明である。

PRR が対応する PAMP を認識すると、PRR は Brassinosteroid insensitive1-associated receptor kinase 1(BAK1)や Chitin elicitor receptor kinase 1(CERK1)といった共受容体と相互作用し(Chinchilla *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2014), Receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK)によりカルシウムイオンチャネルが活性化され、細胞内へのカルシウムイオンの流入が起こり(Ranf *et al.*, 2014), NADPH オキシダーゼである Respiratory burst oxidase homolog (RBOH)を介した活性酸素種の生成が誘導される(Kadota *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). 並行して、MAPK カスケードの活性化が誘導され(Rasmussen *et al.*, 2012), WRKY や Ethylene responsive factor (ERF)などの転写因子の活性化を介して下流の転写因子の活性化や防御関連遺伝子の転写誘導が起こり(Rasmussen *et al.*, 2012; Birkenbihl *et al.*, 2017), 抗菌性物質の生成・蓄積やサリチル酸、ジャスモン酸、エチレンといった防御関連植物ホルモンの合成、カロース沈着などの応答が誘導される(Luna *et al.*, 2011; Bigeard *et al.*, 2015; Björnson *et al.*, 2021). しかしながら、PTI を制御する情報伝達関連因子のネットワークの全体像は、最も解析が進んでいるモデル植物シロイヌナズナにおいても未だ解明されていない。

本稿では、モデル植物シロイヌナズナの生物発光レポーター植物を用いた表現型解析と遺伝子単離手法MutMapを組み合わせた変異体・遺伝子単離手法「Lumi-Map法」と、本手法を活用することにより近年明らかになった病原菌由来スフィンゴ脂質分子が植物により認識される分子機構について紹介する。

2. Lumi-Map 法による変異体・原因遺伝子特定システムの構築

植物の抵抗反応情報伝達経路の解明においても、変異体の単離とその原因遺伝子の特

定・解析からなる順遺伝学的な手法は多くの研究で取り入れられ、多くの新奇遺伝子の発見に貢献してきた。これらの研究では、従来のマップベースクローニング法を中心に遺伝子の特定がなされてきた。近年、次世代シーケンス技術および解析手法の飛躍的な発展により、特徴的な表現型を持つ変異体からの原因遺伝子の特定に全ゲノム配列情報を利用する手法が開発されてきた。その中でも、MutMap 法は変異体を持つ原因変異を 1 回の全ゲノムシーケンスにより特定することができるため、迅速かつ低コストでの遺伝子単離を実現している(Abe *et al.*, 2012)。

著者らは、植物の抵抗反応誘導に必要な新奇遺伝子を大規模かつ迅速に単離するため、生物発光レポーター系統を用いた表現型解析と MutMap 法を組み合わせる「Lumi-Map 法」を構築した(図 1, Kato *et al.*, 2020)。大規模な表現型解析において、生物発光レポーター生物を用いた解析手法は強力なツールである。著者らは、モデル植物シロイヌナズナのストレス応答時に遺伝子発現が誘導される種々のマーカー遺伝子のプロモーターとホタルルシフェラーゼ遺伝子(*LUC*)を連結したレポーターカセットを保持するシロイヌナズナ耐病性レポーター系統を 15 系統作出し、現在も病害応答性レポーター系統に限らず、様々な植物の生理応答時に活性化するレポーター系統を順次追加中である(Kato *et al.*, 2020)。Lumi-Map 法により、変異体・原因遺伝子単離が実施できることを示すため、植物の PTI 情報伝達機構の解明が最も進んでいる細菌の鞭毛タンパク質由来ペプチド *flg22* と植物の LRR 型の PRR である *FLAGELLIN-SENSING 2(FLS2)*により起動する抵抗反応をモデルとした(Gómez-Gómez and Boller, 2000)。作出したレポーター系統のうち、*WRKY29-LUC* レポーター系統は *flg22* 処理により生物発光応答を誘導する。*WRKY29-LUC* レポーター系統に EMS 処理を行うことにより変異集団(M₂ 種子)を作出し、*flg22* 応答時の生物発光応答を指標として、約 24,000 の M₂ 変異体実生に対してスクリーニングを実施し、22 系統の変異体を得た。得られた変異体の中に 5 系統の *flg22* に対して特異的に応答を示さない変異体を得られ、原因遺伝子を特定したところ、5 系統全てが *flg22* の受容体遺伝子である *fls2* の変異体であった。また、本研究では *FLS2* に加えて、*Ethylene responsive factor 019(EFR019)*, *THO/TREX(suppressors of the transcription defects of hpr1Δ mutants by overexpression-Transcription and Export)* ファミリーに属するタンパク質をコードする *THO5*, *Cyclin-dependent kinase 8(CDK8)*, *High-level expression of sugar-inducible 2(HSI2)* の変異体を得られ、これらの変異体は植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 に対する抵抗性の低下が認められた(Tsukagoshi *et al.*, 2005; Yelina *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014; Francisco-Mangilet *et al.*, 2015; Qüesta *et al.*, 2015; Sørensen *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019; Kato. *et al.*, 2020)。

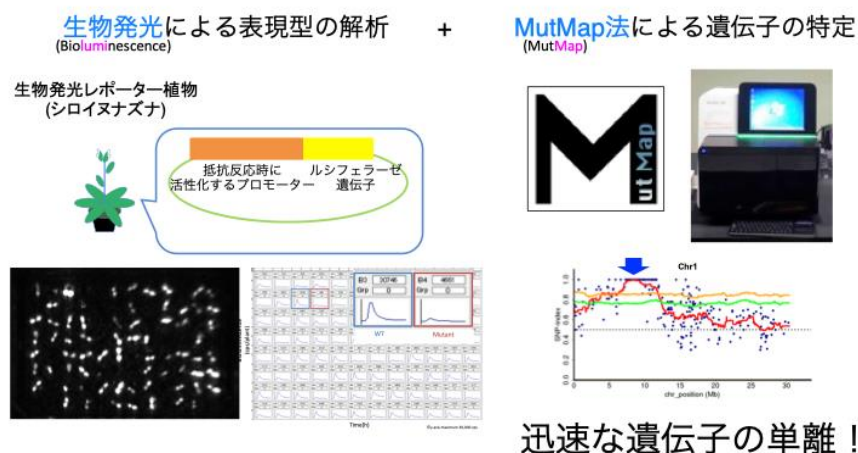


図1. Lumi-Map法の概要

以上のように Lumi-Map 法を用いることにより, PTI 情報伝達に関わる因子を迅速に特定することに成功した. また, 特定の PAMP 特異的に無応答の変異体は当該 PAMP に対する受容体の変異体である可能性が高く, この結果は Lumi-Map が様々な PAMP あるいは微生物抽出物を入力シグナルとして, 新奇の PAMP 受容体および下流の情報伝達因子を同定するための強力なプラットフォームであることを示唆している.

3. 植物は微生物由来の脂質分子を認識し, 抵抗反応を誘導する

これまでに植物病原性卵菌類の一種であるジャガイモ疫病菌(*Phytophthora infestans*)のメタノール抽出画分から, ジャガイモ懸濁培養細胞に対する活性酸素種(ROS)生成を指標に活性成分 Pi-Cer(*Phytophthora infestans* ceramide)が精製された. 一方で, 同じジャガイモ疫病菌のメタノール抽出画分からジャガイモ塊茎に対するファイトアレキシン蓄積誘導の活性を指標に Pi-DAG(*Phytophthora infestans* diacylglycerol)が精製された. この Pi-DEG の構造中にはエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid; EPA)が含まれており, EPA および EPA と構造が類似するアラキドン酸は古くから植物に対する抵抗反応誘導活性が報告されている(Bostock *et al.*, 1981, 2011). さらに興味深いことに, Pi-Cer D と EPA を同時に処理した時にのみ遺伝子発現誘導が認められる防御関連遺伝子が存在することから, 双方の PAMP を認識した下流の情報伝達経路においてクロストークが示唆されている(Monjil *et al.*, 2024).

植物に抵抗反応を誘導する微生物由来の脂質分子の中で, 植物病原細菌由来の脂肪酸の一つである 3-ヒドロキシ脂肪酸 (3-OH-C10:0) に対する植物の受容体 Lipooligosaccharide-specific reduced elicitation(LORE)が最初に明らかにされた(Ranf *et al.*, 2015; Kutschera *et al.*, 2019). シロイヌナズナ LORE は S-locus lectin receptor-like kinase(SRK)をコードする細胞膜受容体キナーゼ遺伝子である. SRK はリガンドを受容した際の情報伝達にホモ二量体を形成することが重要であることが示唆されている. アブラナ科植物の自家不和合性を支配する SRK の細胞外ドメインタンパク質は, S-locus cysteine-rich protein (SCR)と結合することにより, SRK のホモ二量体が形成されることが *in vitro* 条件下での試験において示されている(Ma *et al.*, 2016). シロイヌナズナ LORE が 3-OH-C10:0 を認識した際の情報伝達には, ホモ二量体化が必要である(Kutschera *et al.*, 2019; Shu *et al.*, 2021). さらに, シロイヌナズナ LORE の情報伝達に必要な分子内での結合(homomerization)には, 細胞外ドメインと膜貫通ドメインの両方が影響することが示されている(Eschrig *et al.*, 2024). また, L-type lectin receptor kinase である LecRK-I.1 および LecRK-I.8 は, オオモンシロチョウ(*Pieris brassicae*)の卵に由来するホスファチジルコリンの認識に関わることが報告されている(Stahl *et al.*, 2020; Groux *et al.*, 2021). 植物の脂質認識受容体や下流の情報伝達因子に関しては, 特定されているリガンド-レセプターの組み合わせが極めて少なく, 未知な領域が多い.

4. 微生物由来スフィンゴ脂質を植物が認識するしくみの解明

ジャガイモ疫病菌から精製された Pi-Cer D(図2上)はジャガイモやタバコ, イネやシロイヌナズナに抵抗反応を誘導する(Kato *et al.*, 2022; Monjil *et al.*, 2024). 植物の Pi-Cer D の認識機構を明らかにするため, 著者らは Lumi-Map 法(図1)を用いて, Pi-Cer D 応答変異体の単離および表現型原因遺伝子の機能解析を進めた. 作出したシロイヌナズナ耐病性レポーター

系統のうち, Pi-Cer D および種々の PAMPs に対して顕著な生物発光応答が誘導される WRKY33-LUC レポーター系統を採用し, 約9,000 個体の M₂ 変異集団に対する変異体スクリーニングを行なった. 得られた約 100 系統の Pi-Cer D 低応答変異体のうち, 顕著に発光量が低い系統に対して他の PAMPs に対する応答を評価し, Pi-Cer D 特異的応答変異体を 11 系統選抜した. そのうち 9 系統は Pi-Cer D 無応答変異体であり, 原因遺伝子を決定したところ, 9 系統全てが SRK をコードする *Resistant to DFPM-inhibition of abscisic acid signaling 2* (RDA2) の変異体であった. DFPM ([5-(3,4-dichlorophenyl)furan-2-yl]-piperidine-1-ylmethanethione)はRDA2を介して抵抗反応を誘導し, アブシジン酸の情報伝達を阻害する合成低分子化合物であり, *rda2* 変異体は DFPM 処理に対して応答することができない変異体として単離・同定された(Park *et al.*, 2019). 残りの 2 系統の Pi-Cer D 特異的応答変異体に対して MutMap を適用し, シグナルペプチドを持つセラミダーゼをコードする *Neutral ceramidase 2*(NCER2)を原因遺伝子として同定した. 単離した *rda2* および *ncer2* の変異体はシロイヌナズナに病原性を示すアブラナ科植物べと病菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis* に対する抵抗性が低下していたことから, RDA2 および NCER2 を介した植物の免疫応答が病原菌抵抗性に貢献することが示された(図 3).

植物-微生物の相互作用の第一段階として, 病原菌を含む微生物を構成する物質の中から細胞膜受容体と結合し, 認識できるリガンド分子の切り出しの工程が重要である. 著者らが Lumi-Map により単離した NCER2 は *in vitro* 条件下において Pi-Cer D を分解し, スフィンゴイド塩基を遊離した.

また, NCER2 が植物のアポプラストに局在し, Pi-Cer D からスフィンゴイド塩基への変換が植物の細胞の外で起こることが示された. さらに, Pi-Cer D を構成するスフィンゴイド塩基と脂肪酸のうち, スフィンゴイド塩基にのみ抵抗反応誘導活性が認められた. 以上のことから, NCER2 が植物の細胞外セラミダーゼであり, Pi-Cer D を分解しスフィンゴイド塩基を生成することが明らかになった(図 2, 図 3, Kato *et al.*, 2022). 植物の細胞外での PAMPs の切り出しの報告例として, *Nicotiana benthamiana* の分泌型 β -ガラクトシダーゼ BGAL1 は細菌の鞭毛タンパク質フラジェリンからの flg22 を含むエトープペプチドの切り出しに必要であることが示されている (Buscaill *et al.*, 2019). 近年, シロイヌナズナにおいてもフラジェリンから FLS2 に認識されるリガンドペプチドの切り出しに細胞外 subtilase である SBT5.2 および SBT1.7 が報告された(Matsui *et al.*, 2024). 糸状菌の細胞膜に存在するグルコシルセラミドや Pi-Cer D と同時に単離されたセラミドエタノールアミンである Pi-CerPE D は, より複雑な構造を有するスフィンゴ脂質であり(Koga *et al.*,

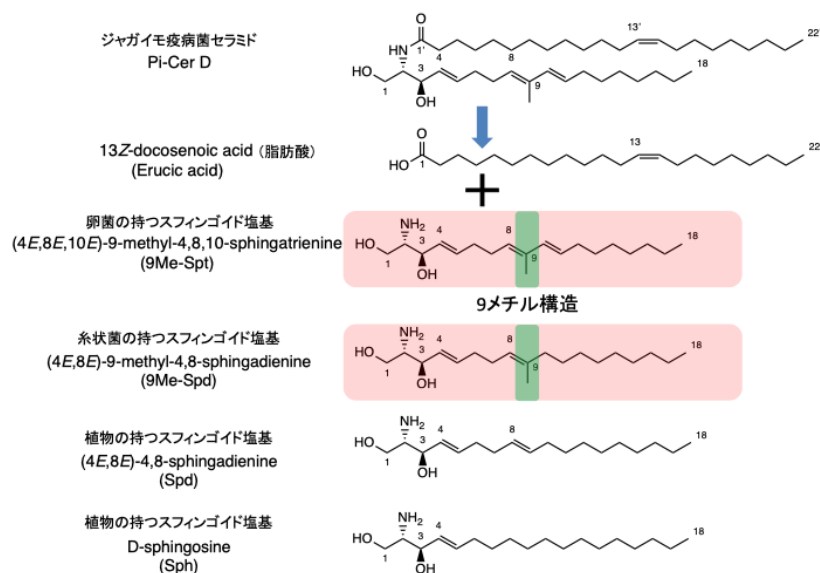


図2. スフィンゴ脂質の構造の比較

1998; Monjil *et al.*, 2024), 植物の細胞外において、これらのスフィンゴ脂質を標的とした分解機構が存在することが想定される。植物のアポプラストにおける微生物-植物の攻防について、今後も解析が進むことが期待される。

スフィンゴイド塩基は生物の細胞膜を構成する脂質の一種であり、真核生物に普遍的に存在する脂質である。Pi-Cer D を構成するスフィンゴイド塩基は (4E,8E,10E)-9-methyl-4,8,10-sphingatrienine であり、9 番目の炭素鎖の位置にメチル基を持つ特徴がある。9-メチルスフィンゴイド塩基を有するスフィンゴ脂質は、糸状菌や卵菌などからは報告されているが、植物には

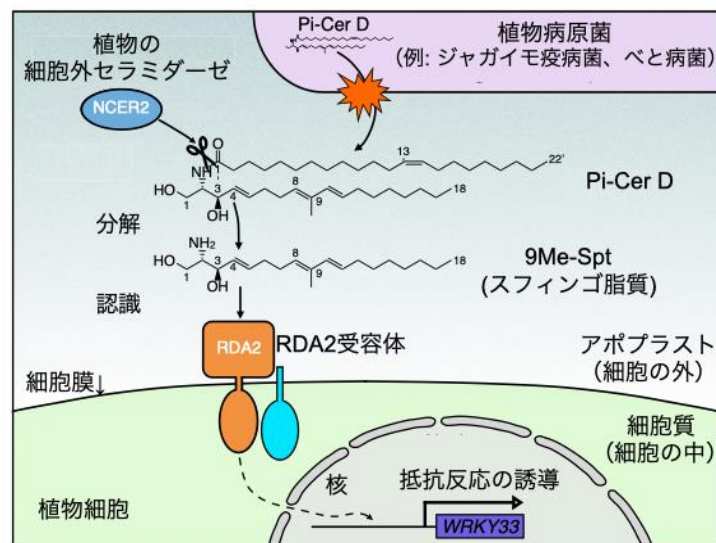


図3. 植物の病原菌由来スフィンゴ脂質の認識機構

存在しておらず、微生物特有の脂質構造であると言える(図 2)。シロイヌナズナは種々のスフィンゴイド塩基を RDA2 を介して認識することができるが、9-メチルスフィンゴイド塩基は 9-メチル構造を持たないスフィンゴイド塩基よりも抵抗反応誘導活性が高く、RDA2 の細胞外ドメインタンパク質とも強く結合した。これらのことから、RDA2 はスフィンゴイド塩基の受容体であり、中でも微生物に特有の 9-メチルスフィンゴイド塩基とより強く結合することにより、病原菌を含む微生物から身を守るように分子進化してきたことが想像される(図 3, Kato *et al.*, 2022)。今後、RDA2 と 9-メチルスフィンゴイド塩基が構造学的にどのような状態で結合しているのか、解明されることが期待される。また、Pi-Cer D やグルコシルセラミド(セレブロシド)はイネやジャガイモ、タバコなど種々の植物に抵抗反応を誘導するため(Koga *et al.*, 1998; Monjil *et al.*, 2024), それらの植物種においても、スフィンゴイド塩基受容体を担うタンパク質が存在することが考えられ、他植物のスフィンゴイド塩基受容体とシロイヌナズナ RDA2 との相違点について比較することにより、植物のスフィンゴイド塩基認識機構についてより理解が深まると考えられる。

5. 最後に

本稿では、生物発光レポーター系統による表現型解析と MutMap を併せて用いる変異体・原因遺伝子単離手法「Lumi-Map 法」と本手法を適用して飛躍的に解明が進んだ植物のスフィンゴ脂質認識機構について紹介した(Kato *et al.*, 2020, 2022)。植物の PTI 情報伝達経路について、シロイヌナズナでの研究例を中心に知見が増えているものの、対象としている PAMPs には未だ偏りが多いのが現状である。実際の感染現場においては、複数種の PAMPs が植物に同時に、あるいは時間差で作用していることが想定され、異なる PAMPs 間の下流の情報伝達経路においてクロストークが存在する可能性が示唆されている(Monjil *et al.*, 2024)。その課題の解明のために、植物が微生物のどの分子(PAMPs)を、どのように(どの PRR が)認識しているのか？、ひとつずつ知見を積み上げていくことが重要で

あると考える。

また, Lumi-Map 法は対象とする生物発光レポーター系統に用いるプロモーターを変更することにより, 植物の耐病応答のみならず, 他の植物の生理現象を対象とした研究にも応用が可能である。本手法が植物科学研究の進展に貢献することを期待する。

謝辞

本研究は, 岩手生物工学研究センターの根本圭一郎博士, 阿部陽博士, 清水元樹博士, ゲノム育種研究部のスタッフ, 名古屋大学大学院生命農学研究科植物病理学研究室の学生諸氏, 京都大学大学院農学研究科の高野義孝教授, 大門高明教授, 小内清博士, 理化学研究所・植物免疫研究グループの白須賢博士, 浅井秀太博士, 石濱伸明博士, 創薬シード化合物探索ユニットの吉田稔博士, 松岡聖二技師らの協力のもとに行われました。また, 名古屋大学川北一人名誉教授, 小鹿一名誉教授, 石浦正寛名誉教授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および JST さきがけの補助を受けて実施しました。

引用文献

- Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat. Biotechnol.* 30:174-178.
- Bender, K.W. and Zipfel, C. (2023) Paradigms of receptor kinase signaling in plants. *Biochem J.* 480:835-854.
- Bigeard, J., Colcombet, J. and Hirt, H. (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* 8:521-539.
- Birkenbihl, R.P., Liu, S. and Somssich, I.E. (2017) Transcriptional events defining plant immune responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38:1-9.
- Bjornson, M., Pimprakar, P., Nürnberger, T. and Zipfel, C. (2021) The transcriptional landscape of *Arabidopsis thaliana* pattern-triggered immunity. *Nat. Plants* 7:579-586.
- Boller, T. and Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern- recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:379-406.
- Bostock, R.M., Kuć, J.A. and Laine, R.A. (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science*. 212: 67-69.
- Bostock, R.M., Savchenko, T., Lazarus, C. and Dehesh, K. (2011) Eicosapolyenoic acids: novel MAMPs with reciprocal effect on oomycete-plant defense signaling networks. *Plant Signal. Behav.* 6:531-533.
- Buscaill, P., Chandrasekar, B., Sanguankiatichai, N., Kourelis, J., Kaschani, F., Thomas, E.L., Morimoto, K., Kaiser, M., Preston, G.M., Ichinose, Y. and van der Hoorn, R.A.L. (2019) Glycosidase and glycan polymorphism control hydrolytic release of immunogenic flagellin peptides. *Science* 364:eaav0748.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A. and Stacey, G. (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* 3:e03766.

- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T. (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497-500.
- de Azevedo Souza, C., Li, S., Lin, A.Z., Boutrot, F., Grossmann, G., Zipfel, C. and Somerville, S.C. (2017) Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant Physiol.* 173:2383-2398.
- Eschrig, S., Schäffer, M., Shu, L.J., Illig, T., Eibel, S., Fernandez, A. and Ranf, S. (2024) LORE receptor homomerization is required for 3-hydroxydecanoic acid-induced immune signaling and determines the natural variation of immunosensitivity within the *Arabidopsis* genus. *New Phytol.* 242:2163-2179.
- Fesel, P.H. and Zuccaro, A. (2016) β -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet. Biol.* 90:53-60.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T. (2000) FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5:1003-1011.
- Groux, R., Stahl, E., Gouhier-Darimont, C., Kerdaffrec, E., Jimenez-Sandoval, P., Santiago, J. and Reymond, P. (2021) *Arabidopsis* natural variation in insect egg-induced cell death reveals a role for LECTIN RECEPTOR KINASE-I.1. *Plant Physiol.* 185: 240-255.
- Hou, S., Liu, D. and He, P. (2021) Phytocytokines function as immunological modulators of plant immunity. *Stress Biol.* 1:8. doi:10.1007/s44154-021-00009-y.
- Huang, P.Y., Zhang, J., Jiang, B., Chan, C., Yu, J.H., Lu, Y.P., Chung, K. and Zimmerli, L. (2019) NINJA-associated ERF19 negatively regulates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *J. Exp. Bot.* 70:1033-1047.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-329.
- 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
- Kato, H., Onai K., Abe A., Shimizu M., Takagi H., Tateda C., Utsushi H., Singkarabanit-Ogawa S., Kitakura S., Ono E., Zipfel C., Takano Y., Ishiura M. and Terauchi R. (2020) Lumi-map, a real-time luciferase bioluminescence screen of mutants combined with MutMap, reveals *Arabidopsis* genes involved in PAMP-triggered immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 33:1366-1380.
- Kato, H., Nemoto, K., Shimizu, M., Abe, A., Asai, S., Ishihama, N., Matsuoka, S., Daimon, T., Ojika, M., Kawakita, K., Onai, K., Shirasu, K., Yoshida, M., Ishiura, M., Takemoto, D., Takano, Y. and Terauchi, R. (2022) Recognition of pathogen-derived sphingolipids in *Arabidopsis*. *Science* 376:857-860.
- Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M. and Ogasawara, N. (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem.* 273:31985-31991.
- Kutschera, A., Dawid, C., Gisch, N., Schmid, C., Raasch, L., Gerster, T., Schäffer, M., Smakowska-Luzan, E., Belkhadir, Y., Vlot, A.C., Chandler, C.E., Schellenberger, R., Schwudke, D., Ernst, R.K., Dorey, S., Hückelhoven, R., Hofmann, T. and Ranf, S. (2019) Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in *Arabidopsis* plants. *Science* 364:178-181.

- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X., Wang, Y., Chen, S., and Zhou, J. M. (2014) The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15:329-338.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Ton, J. (2011) Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:183-193.
- Ma, R., Han, Z., Hu, Z., Lin, G., Gong, X., Zhang, H., Nasrallah, J.B. and Chai, J. (2016) Structural basis for specific self-incompatibility response in *Brassica*. *Cell Res.* 26:1320-1329.
- Matsui, S., Noda, S., Kuwata, K., Nomoto, M., Tada, Y., Shinohara, H. and Matsubayashi, Y. (2024) Arabidopsis SBT5.2 and SBT1.7 subtilases mediate C-terminal cleavage of flg22 epitope from bacterial flagellin. *Nat. Commun.* 15:3762. doi: 10.1038/s41467-024-48108-4.
- Monjil, M.S., Kato, H., Ota, S., Matsuda, K., Suzuki, N., Tenhiro, S., Tatsumi, A., Pring, S., Miura, A., Camagna, M., Suzuki, T., Tanaka, A., Terauchi, R., Sato, I., Chiba, S., Kawakita, K., Ojika, M. and Takemoto, D. (2024) Two structurally different oomycete lipophilic microbe-associated molecular patterns induce distinctive plant immune responses. *Plant Physiol.* doi: 10.1093/plphys/kiae255.
- Ngou, B.P.M., Ding, P. and Jones, J.D.G. (2022) Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* 34:1447-1478.
- Park, J., Kim, T.H., Takahashi, Y., Schwab, R., Dressano, K., Stephan, A.B., Ceciliato, P.H.O., Ramirez, E., Garin, V., Huffaker, A. and Schroeder, J.I. (2019) Chemical genetic identification of a lectin receptor kinase that transduces immune responses and interferes with abscisic acid signaling. *Plant J.* 98:492-510.
- Qüesta, J. I., Song, J., Geraldo, N., An, H., and Dean, C. 2016. Arabidopsis transcriptional repressor VAL1 triggers Polycomb silencing at FLC during vernalization. *Science* 353:485-488.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Fröhlich, K., Westphal, L., Scheel, D. and Lee, J. (2014) Microbe-associated molecular pattern-induced calcium signaling requires the receptor-like cytoplasmic kinases, PBL1 and BIK1. *BMC Plant Biol.* 14:374.
- Rasmussen, M.W., Roux, M., Petersen, M. and Mundy, J. (2012) MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. *Front. Plant Sci.* 3:169.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G. and Chinchilla, D. (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem.* 285:9444-9451.
- Sharma, N., Bender, Y., Boyle, K. and Fobert, P.R. (2013) High-level expression of sugar inducible gene2 (HSI2) is a negative regulator of drought stress tolerance in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 13:170.
- Shibuya, N. and Minami, E. (2001) Oligosaccharide Signalling for Defense Responses in Plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:223-233.
- Shu, L.-J., Schäffer, M., Eschrig, S. and Ranf, S. (2021) Low cost, medium throughput depletion-binding assay for screening S-domain-receptor ligand interactions using in planta protein expression. *bioRxiv* doi:10.1101/2021.06.16.448648.
- Stahl, E., Brillatz, T., Ferreira Queiroz, E., Marcourt, L., Schmiesing, A., Hilfiker, O., Riezman, I., Riezman, H., Wolfender, J.L. and Reymond, P. (2020) Phosphatidylcholines from *Pieris brassicae* eggs activate an immune response in Arabidopsis. *eLife* 9: e60293.

- Sun, Y., Li, L., Macho, A.P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.M. and Chai, J. (2013) Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* 342:624-628.
- Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A. and Nakamura, K. (2005) Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* 138:675-685.
- Umemura, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., Iwata, M., Shimura, M. and Koga, J. (2000) Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* 41:676-683.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C.A. (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10104-10109.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T. and Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* 125:749-760.
- Zhu, Y., Schluttenhoffer, C.M., Wang, P., Fu, F., Thimmapuram, J., Zhu, J.K., Lee, S.Y., Yun, D.J. and Mengiste, T. (2014) CYCLIN-DEPENDENT KINASE8 differentially regulates plant immunity to fungal pathogens through kinase-dependent and -independent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* 26:4149-4170.

病原微生物を認識する植物の NLR 受容体の分子進化

安達 広明^{*}・本田 晃大^{*}・Liu Tianpin^{*}・松永 志基^{**}・藤田 健太郎^{***}・大津 美奈^{****}・堺 俊之^{*}

Adachi, H., Honda, K., Liu, T., Matsunaga, M., Fujita, K., Ohtsu, M., and Sakai, T.

Molecular evolution of plant NLR immune receptors to recognize pathogens

Abstract

Plants have evolved a multi-layered immune system that is activated by immune receptors upon recognizing diverse pathogen molecules in either the extracellular or intracellular space of host cells. One of these immune receptors is the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing protein (NLR) family, which comprises intracellular immune receptors that recognize pathogen-secreted effectors. The evolution of NLRs is characterized by a continuous arms race between plants and pathogens, leading to the rapid evolution and diversification of plant NLR genes. Recent studies in plant NLR biology have revealed that many plant NLRs have functionally specialized to recognize pathogen effectors, activate immune signaling or negatively regulate excessive immunity. These sub-functionalized NLRs form a network-type receptor system called the NLR network. Here, we introduce an evolutionary model of plant NLR networks and discuss how they are formed, activated, and regulated.

Key words: Plant immunity, autoimmunity, NLR, pathogen effector, molecular evolution

^{*} 京都大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Kyoto University (Corresponding author: adachi.hiroaki.3s@kyoto-u.ac.jp)

^{**} 京都大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyoto University

^{***} 大阪大学大学院薬学研究科 Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University

^{****} 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology

1. はじめに

自然界において、植物は糸状菌、卵菌、細菌、ウイルス、線虫など様々な病原微生物の脅威にさらされている。しかし、植物は強固な免疫系を活用し、それら病原微生物の感染を阻止する。植物の免疫系は、宿主の細胞膜上や細胞内に存在する種々の免疫受容体が病原体分子を認識した際に活性化される (Lu and Tsuda, 2021)。植物細胞内の免疫受容体は、nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing protein (NLR) と呼ばれ、エフェクターと総称される病原体由来の分泌タンパク質を認識する。エフェクター認識により活性化した NLR は、多くの場合、局所的なプログラム細胞死を含む過敏感反応 (hypersensitive response ; HR) を誘導し、このような抵抗反応は effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれる。これまでの耐病性育種により同定された抵抗性遺伝子 (*R* 遺伝子) の多くは、NLR タンパク質をコードしており、NLR は植物において病害抵抗性形質を決定する免疫系の中心分子と言える。

NLR は、動植物に共通して自然免疫を誘導する免疫受容体として知られる (Jones et al., 2016; Sundaram et al., 2024)。植物の NLR は、共通して中央部に nucleotide-binding domain shared with APAF-1, various R proteins, and CED-4 (NB-ARC)

ドメイン、C 末端に leucine-rich repeat (LRR) ドメインをもつ (図 1A)。一般的に、LRR はエフェクター認識に、NB-ARC ドメインは、核酸結合部位における ADP と ATP の置換により、NLR タンパク質の活性化に関与する。N 末端ドメインは、coiled-coil (CC) および toll/interleukin-1 receptor homology (TIR) が代表的であるが、現在、系統解析の進展により、植物の NLR 遺伝子ファミリーは、N 末端ドメインの種類により 3 つのサブグループ、1) TIR-NLR, 2) CC-NLR, 3) RPW8-type CC-NLR (CC_R-NLR) に分けられる (図 1A; Kourelis et al., 2021)。それら N 末端ドメインは、いずれも免疫誘導に関与する。

1994 年に初めて NLR 遺伝子が単離されて以来、植物の NLR タンパク質の分子機能は、長きに渡り謎に包まれていた (Mindrinos et al., 1994; Whitham et al., 1994)。しかし、近年のクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) の技術発展により、植物 NLR の活性化メカニズムと分子機能がタンパク質構造レベルで解き明かされてきた。例えば、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の CC-NLR である ZAR1 は、活性化前は単量体であるが、活性化後には“レジストソーム”と総称されるホモ 5 量体を形成する (図 1B; Wang et al., 2019a; Wang et al., 2019b)。ZAR1 レジストソームは細胞膜上でカチオンチャネルとして機能し、植物細胞内にカルシウムイオン (Ca²⁺) を流入させ、免疫応答を活性化する機構が提唱された (Bi et al., 2021)。また、シロイヌナズナの TIR-NLR である RPP1 は、活性化した際にホモ 4 量体のレジストソームを形成し、TIR ドメインが有する NADase 活性により低分子化合物を生合成し、下流の細胞死応答を誘導する (図 1B; Ma et al., 2020)。類似した立体構造と分子機能は、コムギ (*Triticum monococcum*) の CC-NLR である Sr35 や、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の TIR-NLR である ROQ1 においても報告されている (Martin et al., 2020; Förderer et al., 2022; Zhao et al., 2022)。

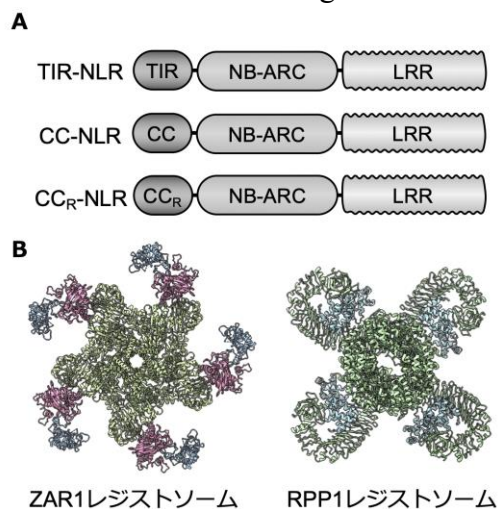


図1. 植物NLRのタンパク質構造
(A) 植物NLRタンパク質の典型的なドメイン構造
(B) ZAR1およびRPP1のレジストソーム構造
(PDB: 6J5T, 7CRC)

以上のように、植物 NLR タンパク質の生化学的機能の理解は、代表的な NLR を中心に飛躍的に進歩してきた。しかし、植物と病原微生物の共進化は、作物をはじめとして様々な植物種で NLR 遺伝子の多様化をもたらしている。特に近年、多くの NLR は単独ではなく、複数の NLR が協調的に機能することで、多種多様な病原体エフェクターを認識し、免疫応答を誘導する機構がわかってきた。複数の NLR から成る免疫受容体機構は、どのように進化し、どのように制御されているのだろうか。本稿では、植物の NLR の分子進化について、筆者らの研究成果を中心に紹介する。

2. 植物 NLR 受容体の多様性

獲得免疫系をもつ哺乳類のヒトやマウスは、比較的少数の NLR 遺伝子（ヒト:23 遺伝子、マウス:34 遺伝子）を持つのに対し、種子植物のゲノムには、数百から数千の NLR 遺伝子がコードされている（図2; Kourelis et al., 2021; Sundaram et al., 2024）。そして、これら NLR 遺伝子は植物種ごとに多様化しており、例えば、シロイヌナズナには TIR-NLR が 100 遺伝子以上あるのに対し、イネ（*Oryza sativa*）は TIR-NLR を持たない（図2）。このような NLR 遺伝子の数や種類の違いは、各植物種における遺伝子の重複や欠失によるものと考えられる（Barragan and Weigel, 2021）。また、同一の植物種内においても、点変異、アレル間の相同組み換えや遺伝子融合により、系統毎にオルソログ遺伝子の有無や遺伝子多型が認められる（Barragan and Weigel, 2021; Prigozhin and Krasileva, 2021）。そのため、NLR は植物ゲノムの中で最も多様化した遺伝子ファミリーを形成する（Clark et al., 2007）。病原微生物による選択圧は、植物の NLR 遺伝子に急速な進化と多様化をもたらしたと考えられ、様々な病原微生物が存在する環境中において、NLR 遺伝子の多様性は植物の生存戦略の 1 つといえるだろう。

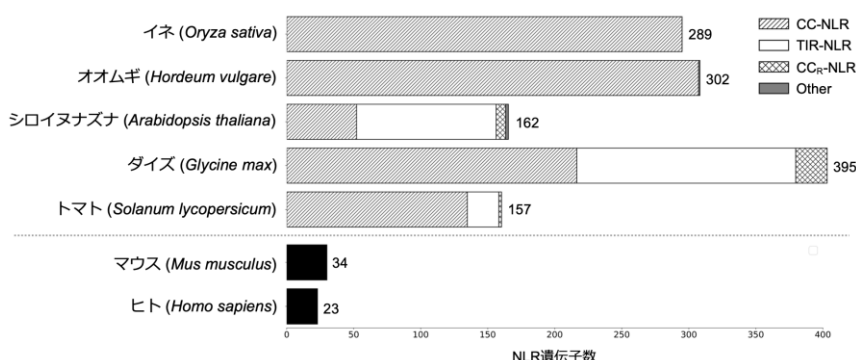


図2. ゲノム上にコードされるNLR遺伝子数
NLRtracker (Kourelis et al., 2021) を用い、植物のプロテオームから全長タンパク質をコードする NLR遺伝子をアノテーションした。マウスおよびヒトのNLR遺伝子は、Sundaram et al. (2024) を参照。

植物の NLR は、配列が多様であることに加え、植物細胞内で細胞膜、細胞質、核など、それぞれが異なる局在パターンを示す (Cui et al., 2015)。しかし、活性化した各 NLR タンパク質は、 Ca^{2+} シグナルや MAP キナーゼ経路の活性化、活性酸素種の生産、転写リプログラミング、HR 細胞死など、類似した免疫応答を誘導する (Adachi and Tsuda, 2019)。これは、細胞内で別の場所に存在する個々の受容体が活性化した際、共通の信号伝達経路へと免疫シグナルが収束することを示唆する。

それでは、植物の多様な NLR タンパク質は、どのように共通の植物免疫系を活性化するのだろうか。Harold Flor の遺伝子対遺伝子説では、宿主側の 1 つの *R* 遺伝子と病原体側の 1 つの非病原力遺伝子 (*Avr* 遺伝子) の組み合わせにより、病害抵抗性が誘導されることが提唱された (Flor, 1971)。現在、この遺伝学的病害抵抗性モデルは、*R* 遺伝子にコードされる 1 つの NLR 受容体が *Avr* エフェクターを認識し、免疫応答を誘導する生化学的モデルとして

解釈できる。本稿では、「エフェクター認識」と「シグナル誘導」の2つの役割を担うNLRを“シングルトンNLR”と定義する(図3; Adachi et al., 2019a)。前に述べたシロイヌナズナのZAR1とコムギのSr35は、シングルトンNLRとして機能することが、タンパク質構造レベルで証明された例である。

近年、植物のNLRの多くが、「認識」と「シグナル誘導」のそれぞれの役割に機能分化し、複数のNLRが協調してはたらくことが示された(Adachi et al., 2019a; Kourelis and Adachi, 2022; Contreras et al., 2023)。例えば、イネのCC-NLRであるPik-1は、病原体エフェクターの認識に特化した“センサーNLR”と定義され、ゲノム上で近傍に位置するPik-2と共に“NLRペア”として機能し、免疫応答を誘導する(図3; Maqbool et al., 2015)。Pik-2のような免疫シグナルの活性化に必要なNLRは、“ヘルパーNLR”と呼ばれる。さらに、このようなNLRペアに加え、複数のセンサーNLRとヘルパーNLRが協調的にはたらく“NLRネットワークモデル”も見出された(図3)。ナス科植物(solanaceous plants)では、NRC2, NRC3およびNRC4など、同一のCC-NLRサブクレードに属するパラログ遺伝子が、R遺伝子にコードされる数多くのセンサーNLRの下流で、ヘルパーNLRとして免疫シグナル誘導に関わる(NRCネットワーク)(Wu et al., 2017; Sakai et al., 2024a)。このような免疫受容体が構成するシグナルネットワークは、多様な病原体分子の認識による免疫信号が、共通したシグナルハブに収束し、類似した免疫応答を誘導することを示す例といえる(Nobori et al., 2018; Adachi and Kamoun, 2022)。

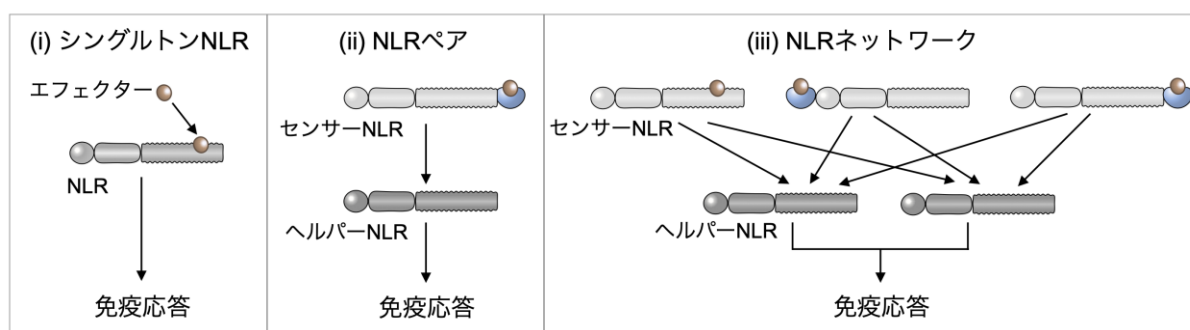


図3. 植物のシングルトンNLR, NLRペア, NLRネットワークモデルの概念図

3. 植物NLR受容体の分子進化

近年、様々な植物のゲノム情報の解読と大規模な系統学的解析により、植物NLR遺伝子の進化の軌跡が明らかになりつつある(Sakai et al., 2024b)。筆者らは、植物のNLRペアおよびネットワークは、祖先型シングルトンNLRの機能分化に由来すると仮説を立てた(図4; Adachi et al., 2019a; Adachi and Kamoun, 2022; Contreras et al., 2023)。本稿では、シングルトンNLR, NLRペア, NLRネットワークの分子進化の一例を紹介する。

筆者らは、植物種間で比較ゲノム解析を行い、シングルトンNLRであるZAR1が、双子葉植物および単子葉植物に最も広く保存されたCC-NLRであり、約1億5千万年前に種子植物が獲得した遺伝子であると推定した(Gong et al., 2022; Adachi et al., 2023a)。興味深いことに、ZAR1のように、種子植物が進化の初期に獲得し、ゲノムに保存され続けているCC-NLR遺伝子は他に存在しない(Adachi et al., 2023a)。なぜZAR1は、種子植物ゲノムに例外的に長く保存され続けているのだろうか。それは、ZAR1が宿主のRLCKタンパク質を介し、間接的にエフェクターを認識する機構を獲得したことに起因すると考えられる。

ZAR1 オルソログ間でアミノ酸配列を比較したところ、RLCK タンパク質の結合領域がどの植物においても高度に保存されていることが分かった (Adachi et al., 2023a) . これは、各植物種が分岐する前から、ZAR1 が RLCK を介してエフェクターを認識していたことを示唆する。さらに、ZAR1 は多くの場合、シングルコピー遺伝子として種子植物ゲノムにコードされるのに対し、ZAR1 と協調的に機能する RLCK は、それぞれの植物種でコピー数の増加・多様化が認められる (図 4; Gong et al., 2022; Adachi et al., 2023a) . 筆者らは、ベンサミアナタバコの異種発現実験において、複数の植物からクローニングしたそれぞれの ZAR1 と RLCK が協調的に機能し、HR 細胞死を誘導することを示した (Adachi et al., 2023a) . 以上のことから、病原微生物との共進化により、エフェクター認識に関わる RLCK 遺伝子が多様化し、ZAR1 は RLCK と相互作用し免疫シグナルを誘導する役割として、種子植物に保存され続けてきたと考えられる (図 4) .

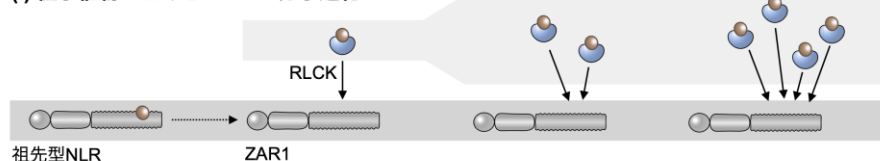
また、共通の祖先型 NLR から、NLR ペア・ネットワークへと発展したことを示唆する手掛かりがある。ナス科植物の NRC ネットワークでは、ゲノム上の異なる位置に存在する多数の NLR が協調的に機能するが、それらセンサーNLR とヘルパーNLR は、系統樹上で姉妹クレードを形成する (Wu et al., 2017; Sakai et al., 2024a) . したがって、祖先型の NLR が遺伝子重複し、機能分化することによってセンサーNLR とヘルパーNLR の組が形成されたと考えられる (図 4; Adachi et al., 2019a; Adachi and Kamoun, 2022; Contreras et al., 2023) . 筆者らは、NRC ネットワークの起源を辿り、ナス科植物を含むキク類植物 (asterids) のゲノムに広く保存されたヘルパーNLR として *NRC0* 遺伝子を同定した (Sakai et al., 2024a) . 興味深いことに、*NRC0* 遺伝子はセンサーNLR クレードに属する遺伝子とゲノム上でクラスターを形成し、NLR ペアとして協調的に機能、HR

細胞死を誘導する

(Sakai et al., 2024a) .

したがって、ナス科植物で発展・拡大した NLR ネットワークは、*NRC0* が構成するような NLR ペアに由来すると考えられる (図 4) .

(i) 種子植物におけるZAR1の分子進化



(ii) ナス科植物におけるNRCネットワークの分子進化

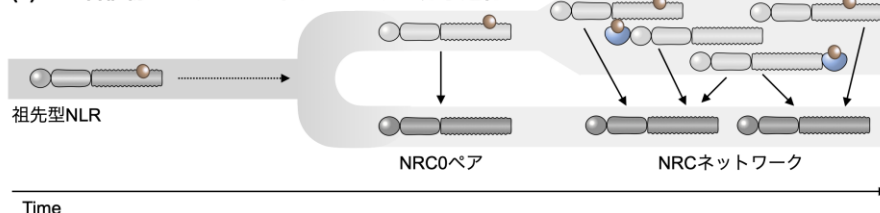


図4. 植物NLR遺伝子の分子進化モデル

最近の研究から、機能分化した植物のヘルパーNLR およびセンサーNLR の特徴についても明らかになりつつある。筆者らが行ったナス科植物のヘルパーNLR, *NRC4* 遺伝子を対象としたランダムなトランスポゾン挿入変異実験から、*NRC4* の N 末端にある 29 アミノ酸が、免疫応答の誘導に十分であることが見出された (Adachi et al., 2019b) . この領域には、CC-NLR に広く保存された配列パターン (MADA モチーフ: MADAxVSFxVxKLxxLLxxEx) があり、MADA モチーフに変異を導入すると、*NRC4* の免疫誘導能は失われる (Adachi et al., 2019b) . MADA モチーフは、ZAR1 や Sr35 を含むシングルトン NLR に加え、Pik-2 や *NRC0*, *NRC2*, *NRC3*, *NRC4* などヘルパーNLR にも高度に保存される (図 5; Adachi et al., 2019b; Adachi et al., 2023a; Sakai et al., 2024a) . 実際に、こ

れら遺伝子の MADA モチーフに変異を導入すると、免疫誘導が顕著に抑制される (Wang et al., 2019b; Adachi et al., 2019b; Förderer et al., 2022; Harant et al., 2022; Sakai et al., 2024a) . MADA に類似した配列 (MAEPL モチーフ) は、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) が持つ CC-NLR 遺伝子においても見出され、N 末端の MADA 様配列を介した免疫誘導機構の起源は、陸上植物の進化の初期まで遡ると考えられる (Chia et al., 2024) . 興味深いことに、この MADA モチーフは、センサーNLR には保存されていない。したがって、免疫応答を自身で誘導する必要がないセンサーNLR においては、MADA モチーフに変異が起こり、シグナル誘導能が退化したと考えられる。

このような機能分化により、変異蓄積や新規ドメインの挿入は、センサーNLR 遺伝子に起こりやすくなったと考えられる。例えば、NRC0 ペアにおいてアミノ酸変異を検出すると、ヘルパーNLR である NRC0 と比較し、センサーNLR の CC および LRR ドメインに、より多くの変異蓄積が認められる (図 5; Sakai et al., 2024a) . さらに、NRC ネットワークを構成する多くのセンサーNLR には、ヘルパーNLR にはない Solanaceous Domain (SD) と呼ばれる挿入ドメインがある (Adachi et al., 2019b; Seong et al., 2020) . SD は、エフェクター認識に関与することが、先行研究で報告されている (Lukasik-Shreepaathy et al., 2012; Saur et al., 2015; Li et al., 2019) . したがって、上述のような NLR の機能分化は、急速に進化する病原微生物の多種多様なエフェクターに対抗する、センサーNLR 遺伝子の多様性獲得、ひいては植物 NLR 免疫系の頑強性の仕組みに繋がる分子進化であったと考えられる。

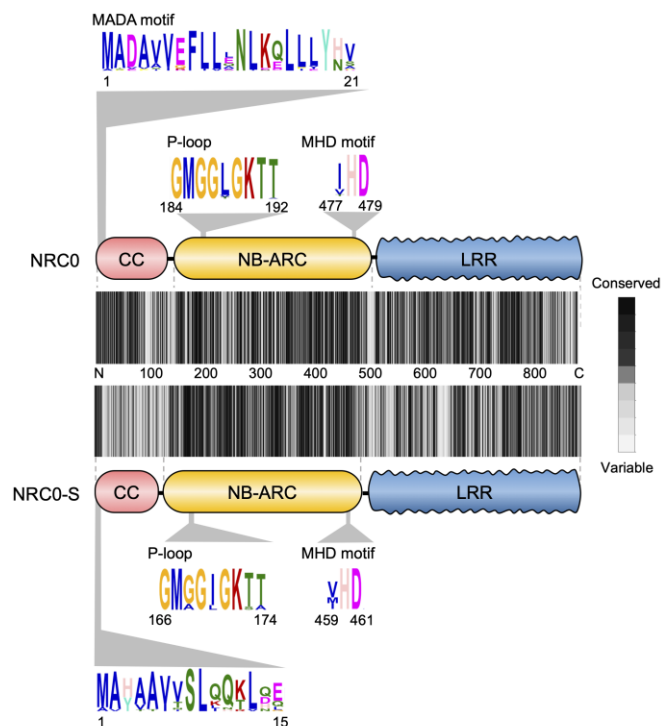


図5. NRC0 (ヘルパーNLR) と NRC0-S (センサーNLR) のアミノ酸配列比較
(引用: <https://doi.org/10.1101/2023.10.23.563533>)

4. NLR ネットワークによる免疫誘導機構

複数のセンサーNLR、ヘルパーNLR が機能する NLR ネットワークにおいて、活性化した NLR はどのように免疫応答を誘導するのだろうか. Cryo-EM による単粒子解析により、ナス科植物のヘルパーNLR である NRC2 は、活性化前にホモ 2 量体、4 量体、さらに高次フィラメント構造を形成することが見出された (図 6; Ma et al., 2024) . このような複合体構造は、リガンド認識前のヘルパーNLR の免疫活性を抑制する役割があると考えられている (Ma et al., 2024) . 活性化後の NLR 複合体については、MADA モチーフ変異により細胞死応答を抑制することで、生化学的・構造生物学的解析が技術的に可能となった (Adachi et al., 2019b) . MADA 変異体を活用した blue-native PAGE (BN-PAGE) 実験が実施され、センサーNLR の Rx, Bs2, Rpi-amr1, Rpi-amr3, および NRC0-S の活性化は、NRC2 および NRC0 の 720~1048 kDa 複合体の形成を誘導した (Ahn et al., 2023; Contreras et al., 2023b;

Sakai et al., 2024a) . 興味深いことに、活性化したセンサーNLR は、NRC 高次複合体に含まれない。これらの結果から、“activation-and-release モデル” と呼ばれる、センサーNLR が対応するヘルパーNLR のホモオリゴマー化を誘導する機構が提唱された (Contreras et al., 2023b) . このモデルを支持するように、活性化した NRC2 および NRC4 がホモ 6 量体のレジストソームを形成する様子が、Cryo-EM によって観察された (図 6; Liu et al., 2024; Madhuprakash et al., 2024) . これら Cryo-EM レジストソーム構造では、MADA モチーフが定義する N 末端領域の構造が決定できていない。AlphaFold 3 (AF3) によって NRC2 レジストソームをモデル化すると、ZAR1 レジストソームと同様に、MADA モチーフ領域は NRC2 レジストソーム表面で漏斗状構造を形成すると予測される (図 6) .

一方で、活性化したセンサーNLR が、どのようにヘルパーNLR のレジストソーム形成を誘導するかは未解明である。筆者らは、一過的発現系を用いた BN-PAGE 実験において、センサーNLR の NB-ARC ドメインの一部を発現させた際、NRC2 のレジストソーム形成が誘発されることを示した (Contreras et al., 2024) . したがって、活性化に伴うセンサーNLR の立体構造変化が、センサー側の NB-ARC ドメインとヘルパーNLR の相互作用を可能にし、二次的にヘルパーNLR の活性化を引き起こす可能性が示唆される。

以上の報告から、シングルトン NLR が 5 量体レジストソームを形成するのに対し、ヘルパーNLR は 6 量体レジストソームを形成すると示された。このように、活性化高次複合体の分子数には違いがみられる一方、いずれのレジストソームも細胞膜上に局在し、MADA 配列が構成する漏斗状構造を介した細胞内 Ca^{2+} 流入を誘導する。 (Duggan et al., 2021; Contreras et al., 2023b; Liu et al., 2024) . したがって、

シングルトン NLR, NLR ペア, NLR ネットワークにおいて、「シグナル誘導」の役割を担う NLR が Ca^{2+} チャンネルとして機能することが、共通の下流免疫経路を活性化する仕組みかもしれない。

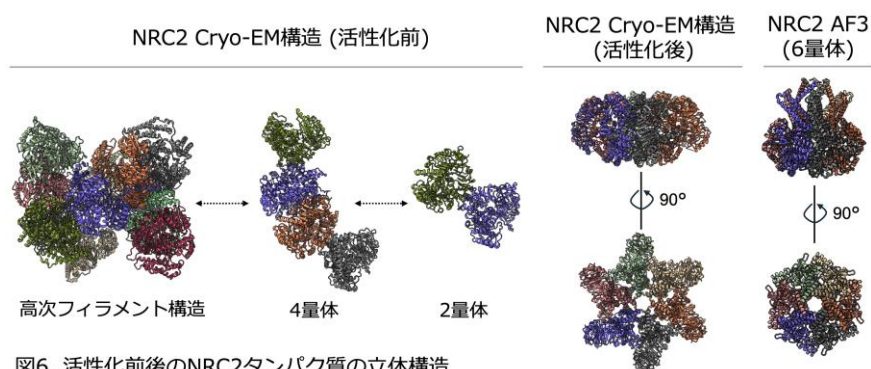


図6. 活性化前後のNRC2タンパク質の立体構造 (PDB: 8XUV, 8XUQ, 8XUO, 9FP6) (AF3: NbNRC2, CC-NB-ARCドメイン, hexamer, 50xOLA)

5. NLR ネットワークの制御機構

一般に、NLR が誘導する免疫応答と植物の成長はトレードオフの関係にある。例えば、異なる系統を交配した際、複数の NLR 遺伝子座のミスマッチにより誘導される自己免疫応答・矮性形質は、“hybrid necrosis” と呼ばれる (Adachi et al., 2019a) . したがって、NLR は、適切な時にのみ活性化するように、厳密に制御される。近年の研究で、いくつかの NLR が、ヘルパーNLR が誘導する免疫応答を負に制御することが明らかになってきた。NLR ペアの事例を紹介すると、センサーNLR であるシロイヌナズナの RRS1 およびイネの RGA5 は、パートナーであるヘルパーNLR, RPS4 および RGA4 の免疫応答誘導活性をそれぞれ負に制御する (Williams et al., 2014; Césari et al., 2014) . この制御は、RRS1 および RGA5 がエフェクターを認識した際に解除され、ヘルパーNLR が免疫を活性化するという仕組みで

ある。

NLR ネットワークにおいては、センサーNLR やヘルパーNLRに加え、免疫制御の役割を担う“モジュレーターNLR”が存在することが報告された (Wu et al., 2022; Adachi et al., 2023b) . *NRC2* および *NRC3* のパラログ遺伝子である *NRCX* は、ノックダウンするとベンサミアナタバコ植物は自己免疫応答を伴う矮性形質を示す (図 7; Adachi et al., 2023b) . また、他のヘルパーNLR とは異なり、*NRCX* は、機能的な MADA モチーフを持っておらず、自身で免疫誘導する活性を失っている。そして、*NRCX* は、*NRC2* および *NRC3* が誘導する免疫応答を負に制御する (Adachi et al., 2023b) . したがって、ナス科植物において NRC ネットワークが発展する過程で、シグナルネットワークの不適切な活性化を抑制し、植物の免疫と成長のバランスを調節する役割を *NRCX* が担うようになったと考えられる。

類似したモジュレーターNLR は、シロイヌナズナの NLR ネットワークからも同定されており、*NRG1C* と命名された (Wu et al., 2022) . *NRG1C* 遺伝子は、CC_R-NLR クレードに属するヘルパーNLR、*NRG1A* および *NRG1B* のパラログ遺伝子であり、シグナル誘導ドメインを欠損している。*NRG1C* の過剰発現は、*NRG1A* の誘導する免疫応答を抑制することが示された (Wu et al., 2022) . 哺乳類の NLR 免疫系においても、NLRP12 が、NLRP3 の活性化複合体“インフラマソーム”の形成を抑制することが報告された (Coombs et al., 2024) . このように、リガンド認識やシグナル誘導だけでなく、シグナルのオン/オフ制御を担う NLR 遺伝子も、動植物の NLR 免疫系が獲得してきた重要な分子であると考えられる。

6. 最後に

本稿では、植物 NLR 免疫系の分子進化の仕組みについて一例を紹介した。病原体エフェクターの認識に関わる NLR 遺伝子は、病害抵抗性形質を付与する遺伝資源として古くから耐病性作物の育種に用いられてきた。しかし、交雑や形質転換により NLR 遺伝子を新たに導入した際、NLR が他の植物種・系統で機能しない例や、生育阻害が発生する例が報告されている。これらの問題は、センサーNLR、ヘルパーNLR およびモジュレーターNLR のミスマッチが原因であると思われる。これまでの植物 NLR 免疫学研究では、それら機能分化した NLR 間の特異性決定の仕組みは、明らかになっていない。さらに、細胞内への Ca²⁺ 流入がどのように植物免疫系を活性化するのか、また、Ca²⁺ 流入以外の信号伝達も NLR の下流で活性化するのか、未解明な点はまだ多い。NLR ネットワークの制御機構に関しても、分子レベルでの理解が求められる。今後、様々な栽培作物で、NLR 免疫機構の全体像の理解を分子レベルで進めることが、耐病性育種への貢献に重要だろう。

謝辞

本稿で紹介した内容は、英国センズベリー研究所 Sophien Kamoun 博士研究グループ、奈良先端科学技術大学院大学植物免疫学研究室、京都大学栽培植物起原学研究室諸氏の協力のもとに実施し得られた研究成果を含みます。特に、これまでの研究を進めるにあたり、名

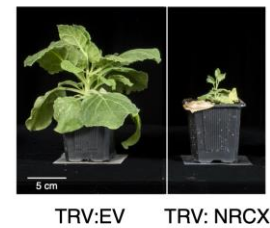


図7. *NRCX*遺伝子をノックダウンすると自己免疫応答が誘導される
TRV:EV (対照区)
TRV:NRCX (*NRCX*ノックダウン植物)
(引用: <https://doi.org/10.1101/2021.11.15.468391>)

古屋大学・吉岡博文准教授，奈良先端科学技術大学院大学・西條雄介教授，京都大学・寺内良平教授には，ご支援とご助言を頂きました．ここに記して感謝の意を表します．本研究の一部は，JSPS 海外特別研究員制度，科学研究費（21K20583，22K14893）ならびに JST さきがけの支援を受けて実施しました．

引用文献

- Adachi, H. and Tsuda, K. (2019) Convergence of cell-surface and intracellular immune receptor signalling. *New Phytol.* 221: 1676-1678.
- Adachi, H., Derevnina, L. and Kamoun, S. (2019a) NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50: 121-131.
- Adachi, H., Contreras, M. P., Harant, A., Wu, C. H., Derevnina, L., Sakai, T., Duggan, C., Moratto, E., Bozkurt, T. O., Maqbool, A., Win, J. and Kamoun, S. (2019b) An N-terminal motif in NLR immune receptors is functionally conserved across distantly related plant species. *eLife* 8: e49956.
- Adachi, H. and Kamoun, S. (2022) NLR receptor networks in plants. *Essays Biochem.* 66: 541-549.
- Adachi, H., Sakai, T., Kourelis, J., Pai, H., Gonzalez Hernandez, J. L., Utsumi, Y., Seki, M., Maqbool, A. and Kamoun, S. (2023a) Jurassic NLR: Conserved and dynamic evolutionary features of the atypically ancient immune receptor ZAR1. *Plant Cell* 35: 3662-3685.
- Adachi, H., Sakai, T., Harant, A., Pai, H., Honda, K., Toghiani, A., Claeys, J., Duggan, C., Bozkurt, T. O., Wu, C. H. and Kamoun, S. (2023b) An atypical NLR protein modulates the NRC immune receptor network in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Genet.* 19: e1010500.
- Ahn, H. K., Lin, X., Olave-Achury, A. C., Derevnina, L., Contreras, M. P., Kourelis, J., Wu, C. H., Kamoun, S. and Jones, J. D. G. (2023) Effector-dependent activation and oligomerization of plant NRC class helper NLRs by sensor NLR immune receptors Rpi-amr3 and Rpi-amr1. *EMBO J.* 42: e111484.
- Barragan, A. C. and Weigel, D. (2021) Plant NLR diversity: the known unknowns of pan-NLRomes. *Plant Cell* 33: 814-831.
- 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.e12.
- Césari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, Y., Shimamoto, K., Dodds, P., Terauchi, R. and Kroj, T. (2014) The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J.* 33: 1941-1959.
- Chia, K. S., Kourelis, J., Teulet, A., Vickers, M., Sakai, T., Walker, J. F., Schomack, S., Kamoun, S. and Carella, P. (2024) The N-terminal domains of NLR immune receptors exhibit structural and functional similarities across divergent plant lineages. *Plant Cell* 36: 2491-2511.
- Clark, R. M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P., Warthmann, N., Hu, T. T., Fu, G., Hinds, D. A., Chen, H., Frazer, K. A., Huson, D. H., Schölkopf, B., Nordborg, M., Ratsch, G., Ecker, J. R. and Weigel, D. (2007) Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 317: 338-342.
- Contreras, M. P., Lüdke, D., Pai, H., Toghiani, A. and Kamoun, S. (2023a) NLR receptors in plant immunity: making sense of the alphabet soup. *EMBO Rep.* 24: e57495.
- Contreras, M. P., Pai, H., Tumas, 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. (2023b) Sensor NLR immune proteins activate oligomerization of their NRC helpers in response to plant pathogens. *EMBO J.* 42: e111519.
- Contreras, M. P., Pai, H., Thompson, R., Marchal, C., Claeys, J., Adachi, H. and Kamoun, S. (2024) The nucleotide-binding domain of NRC-dependent disease resistance proteins is sufficient to activate

- downstream helper NLR oligomerization and immune signaling. *New Phytol.* 243: 345-361.
- Coombs, J. R., Zamoschnikova, A., Holley, C. L., Maddugoda, M. P., Teo, D. E. T., Chauvin, C., Poulin, L. F., Vitak, N., Ross, C. M., Mellacheruvu, M., Coll, R. C., Heinz, L. X., Burgener, S. S., Emming, S., Chamaillard, M., Boucher, D. and Schroder, K. (2024) NLRP12 interacts with NLRP3 to block the activation of the human NLRP3 inflammasome. *Sci. Signal.* 17: eabg8145.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J. E. (2015) Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Ann. Rev. Plant Biol.* 66: 487-511.
- Duggan, C., Moratto, E., Savage, Z., Hamilton, E., Adachi, H., Wu, C. H., Leary, A. Y., Tumtas, Y., Rothery, S. M., Maqbool, A., Nohut, S., Martin, T. R., Kamoun, S. and Bozkurt, T. O. (2021) Dynamic localization of a helper NLR at the plant-pathogen interface underpins pathogen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118: e2104997118.
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Förderer, A., Li, E., Lawson, A. W., Deng, Y. N., 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.
- Gong, Z., Qi, J., Hu, M., Bi, G., Zhou, J. M. and Han, G. Z. (2022) The origin and evolution of a plant resistosome. *Plant Cell* 34: 1600-1620.
- Harant, A., Pai, H., Sakai, T., Kamoun, S. and Adachi, H. (2022) A vector system for fast-forward studies of the HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE1 (ZAR1) resistosome in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 188: 70-80.
- Jones, J. D., Vance, R. E. and Dangl, J. L. (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354: aaf6395.
- 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.
- Kourelis, J. and Adachi, H. (2022) Activation and regulation of NLR immune receptor networks. *Plant Cell Physiol.* 63: 1366-1377.
- Li, J., Huang, H., Zhu, M., Huang, S., Zhang, W., Dinesh-Kumar, S. P. and Tao, X. (2019) A plant immune receptor adopts a two-step recognition mechanism to enhance viral effector perception. *Mol. Plant* 12: 248-262.
- Liu, F., Yang, Z., Wang, C., You, Z., Martin, R., Qiao, W., Huang, J., Jacob, P., Dangl, J. L., Carette, J. E., Luan, S., Nogales, E. and Staskawicz, B. J. (2024) Activation of the helper NRC4 immune receptor forms a hexameric resistosome. *Cell* S0092-8674 (24) 00773-6. Advance online publication.
- Lu, Y. and Tsuda, K. (2021) Intimate association of PRR- and NLR-mediated signaling in plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Int.* 34: 3-14.
- Lukasik-Shreepaathy, E., Slootweg, E., Richter, H., Goverse, A., Cornelissen, B. J. and Takken, F. L. (2012) Dual regulatory roles of the extended N terminus for activation of the tomato MI-1.2 resistance protein. *Mol. Plant-Microbe Int.* 25: 1045-1057.
- Ma, S., Lapin, D., Liu, L., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., Logemann, E., Yu, D., Wang, J., Jirschitzka, J., Han, Z., Schulze-Lefert, P., Parker, J. E. and Chai, J. (2020) Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science* 370: eabe3069.
- Ma, S., An, C., Lawson, A. W., Cao, Y., Sun, Y., Tan, E. Y. J., Pan, J., Jirschitzka, J., Kümmel, F., Mukhi, N., Han, Z., Feng, S., Wu, B., Schulze-Lefert, P. and Chai, J. (2024) Oligomerization-mediated autoinhibition and cofactor binding of a plant NLR. *Nature* 10.1038/s41586-024-07668-7. Advance online publication.
- Madhuprakash, J., Toghani, A., Contreras, M. P., Posbeyikian, A., Richardson, J., Kourelis, J., Bozkurt, T. O., Webster, M. and Kamoun, S. (2024) A disease resistance protein triggers oligomerization of its NLR helper into a hexameric resistosome to mediate innate immunity. *bioRxiv preprint* doi:

<https://doi.org/10.1101/2024.06.18.599586>.

- Maqbool, A., Saitoh, H., Franceschetti, M., Stevenson, C. E., Uemura, A., Kanzaki, H., Kamoun, S., Terauchi, R. and Banfield, M. J. (2015) Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *eLife* 4: e08709.
- Martin, R., Qi, T., Zhang, H., Liu, F., King, M., Toth, C., Nogales, E. and Staskawicz, B. J. (2020) Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ. *Science* 370: eabd9993.
- Mindrinis, M., Katagiri, F., Yu, G. L. and Ausubel, F. M. (1994) The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78: 1089-1099.
- Nobori, T., Mine, A. and Tsuda, K. (2018) Molecular networks in plant-pathogen holobiont. *FEBS Lett.* 592: 1937-1953.
- Prigozhin, D. M. and Krasileva, K. V. (2021) Analysis of intraspecies diversity reveals a subset of highly variable plant immune receptors and predicts their binding sites. *Plant Cell* 33: 998-1015.
- Sakai, T., Contreras, M. P., Martinez-Anaya, C., Lüdke, D., Kamoun, S., Wu, C. H. and Adachi, H. (2024a) The *NRCO* gene cluster of sensor and helper NLR immune receptors is functionally conserved across asterid plants. *Plant Cell* koae154.
- Sakai, T., Toghani, A. and Adachi, H. (2024) Phylogenomics of plant NLR immune receptors to identify functionally conserved sequence motifs. *Bio-protocol* 14: e5023.
- Saur, I. M., Conlan, B. F. and Rathjen, J. P. (2015) The N-terminal domain of the tomato immune protein Prf contains multiple homotypic and Pto kinase interaction sites. *J. Biol. Chem.* 290: 11258-11267.
- Seong, K., Seo, E., Witek, K., Li, M. and Staskawicz, B. (2020) Evolution of NLR resistance genes with noncanonical N-terminal domains in wild tomato species. *New Phytol* 227: 1530-1543.
- Sundaram, B., Tweedell, R. E., Prasanth Kumar, S. and Kanneganti, T. D. (2024) The NLR family of innate immune and cell death sensors. *Immunity* 57: 674-699.
- 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. (2019a) Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* 364: eaav5868.
- Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H. W., Zhou, J. M. and Chai, J. (2019b) Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* 364: eaav5870.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78: 1101-1115.
- Williams, S. J., Sohn, K. H., Wan, L., Bernoux, M., Sarris, P. F., Segonzac, C., Ve, T., Ma, Y., Saucet, S. B., Ericsson, D. J., Casey, L. W., Lonhienne, T., Winzor, D. J., Zhang, X., Coerdts, A., Parker, J. E., Dodds, P. N., Kobe, B. and Jones, J. D. (2014) Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* 344: 299-303.
- Wu, C. H., Abd-El-Halim, A., Bozkurt, T. O., Belhaj, K., Terauchi, R., Vossen, J. H. and Kamoun, S. (2017) NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114: 8113-8118.
- Wu, Z., Tian, L., Liu, X., Huang, W., Zhang, Y. and Li, X. (2022) The N-terminally truncated helper NLR *NRG1C* antagonizes immunity mediated by its full-length neighbors *NRG1A* and *NRG1B*. *Plant Cell* 34: 1621-1640.
- Zhao, Y. B., Liu, M. X., Chen, T. T., Ma, X., Li, Z. K., Zheng, Z., Zheng, S. R., Chen, L., Li, Y. Z., Tang, L. R., Chen, Q., Wang, P. and Ouyang, S. (2022) Pathogen effector AvrSr35 triggers Sr35 resistosome assembly via a direct recognition mechanism. *Sci. Adv.* 8: eabq5108.

イネ白葉枯病抵抗性遺伝子 Xa1 の栄光と没落

吉村 智美*・吉久 采花・山口 公志・川崎 努

Yoshimura, S., Yoshihisa, A., Yamaguchi, K., and Kawasaki, T.

The story of *Xa1*, the bacterial blight resistance gene in rice

Abstract

Bacterial blight (BB) is one of the most devastating diseases of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). More than 45 resistance genes for BB have been found during the last quarter of a century. One of the BB resistance genes, *Xa1* encodes a nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor (NLRs) with an N-terminal BED domain, and recognizes transcription activator-like (TAL) effectors of *Xoo*. To elucidate the molecular mechanisms controlling the induction of immunity by *Xa1*, we used yeast two-hybrid assays to screen for host factors that interact with *Xa1* and identified the AP2/ERF-type transcription factor OsERF101. Molecular complementation assays showed the interactions among *Xa1*, OsERF101 and TAL effectors. Unexpectedly, both the overexpression and the knockout lines of OsERF101 displayed *Xa1*-dependent, enhanced resistance to an incompatible *Xoo* strain. Our results indicate that OsERF101 regulates the recognition of TAL effectors by *Xa1*, and functions as a positive regulator of *Xa1*-mediated immunity. Furthermore, an additional *Xa1*-mediated immune pathway is negatively regulated by OsERF101.

Key words: Plant immunity, nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors (NLRs), rice, transcription activator-like (TAL) effector, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

近畿大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Kindai University
(*Corresponding author: 1988p2@nara.kindai.ac.jp)

1. はじめに

イネ白葉枯病はグラム陰性菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) によって引き起こされる細菌病である。イネの主要な産地であるアジア、アフリカ、アメリカにおいて、甚大な被害をもたらす病害であり、現在でも抵抗性のイネ品種を付けすることが最も効果的な防除方法となっている(Nino-Liu *et al.*, 2006; White & Yang, 2009)。半世紀を超える、白葉枯病に対抗するためのイネの育種は、イネ品種と白葉枯病の菌系の関係についての知見を蓄積することになった。イネと白葉枯病菌は、分子生物学的研究のモデル系として有利に利用されている(Nino-Liu *et al.*, 2006)。これまでに、様々なイネ品種より、約 45 個の抵抗性遺伝子が遺伝学的に同定され、その数は増え続けている。その中で、Xa1 (Yoshimura *et al.*, 1998), Xa2 (Ji *et al.*, 2020), Xa3/Xa26 (Xiang *et al.*, 2006), Xa4 (Hu *et al.*, 2017), xa5 (Iyer & McCouch, 2004), Xa7 (Chen *et al.*, 2021), Xa10 (Tian *et al.*, 2014), xa13 (Antony *et al.*, 2010), Xa14 (Ji *et al.*, 2020), Xa21 (Song *et al.*, 1995), Xa23 (Wang *et al.*, 2015), xa25 (Liu *et al.*, 2011), Xa27 (Gu *et al.*, 2005), xa41 (Hutin *et al.*, 2015) の 13 個はマップベースでクローニングされ、機能の解明への努力が行われている(Yang *et al.*, 2022)。一方で、これらの抵抗性遺伝子は、機能について不明のままであっても、アジアやアフリカにおいて、エリート品種に導入され、実際に使われて白葉枯防除に効果を発揮しているのは素晴らしいことである(Kumar *et al.*, 2020)。

Xa1 は「1」というくらいであるから、最初に同定された白葉枯病抵抗性遺伝子である(Sakaguchi, 1967)。Xa1 を持つイネ品種黄玉に対して、日本菌系 I 群菌を剪葉接種した時の、病斑の止まり方には、何度実験しても感嘆する。未だに、なぜそんなに強いのか、わかっていることの少なさに愕然とするが、しかし、この四半世紀で、Xa1 は CC-BED-NB-LRR 型受容体であることがわかり(Yoshimura *et al.*, 1998)、全ての *Xoo* が分泌する TAL エフェクターを認識して抵抗性を引き起こすことがわかった(Ji *et al.*, 2016)。また、Xa1 が日本菌系 I 群菌に対してだけ、という非常に特異的な菌系にのみ抵抗性を発揮する理由は、多くの白葉枯病菌が interfering TAL (iTAL) エフェクターと呼ばれる、Xa1 と TAL エフェクターの相互作用を「干渉」するエフェクターを獲得しているからであった(Ji *et al.*, 2016; Read *et al.*, 2016)。

私たちは、Xa1 は、全ての白葉枯病菌が持つ TAL エフェクターを認識し、HR を伴う非常に強い抵抗性を誘導するタンパク質として、進化の一時期、最強の白葉枯病抵抗性遺伝子であったと考える。残念ながら、多くの白葉枯病菌が TAL 認識を妨害する iTAL エフェクターを持ったことで、その栄光を失ってしまった。

2. 白葉枯病抵抗性遺伝子

各国、各地域から単離された白葉枯病菌はイネの持つ抵抗性遺伝子への反応によって菌系に分けられ、イネ側の抵抗性遺伝子も菌系に対する抵抗性のパターンによって分類されてきた(Tekete *et al.*, 2020).

白葉枯病菌に対する抵抗性遺伝子の特徴は、これまでクローニングされた遺伝子の中で、植物の抵抗性遺伝子として最も典型的な NB-LRR 型が、1 遺伝子座しか見つかっていないということである。染色体 4 の Xa1 座にコードされる、Xa1 とそのアレル Xa2, Xa14 のみが、N 末端に Coiled-Coil (CC) -BED ドメインを持つ NB-LRR 型の遺伝子である。その他の遺伝子は、受容体型キナーゼ (RLK) ; Xa3/Xa26, Xa21, 膜関連キナーゼ ; Xa4, SWEET 遺伝子のプロモーター変異 ; xa13, xa25, xa41, SWEET 遺伝子の転写活性化に必要な基本転写因子 ; xa5, 膜貫通型で細胞死を起こす Executer タイプ : Xa7, Xa10, Xa23, Xa27 等となっている(Yang *et al.*, 2022).

3. イネ白葉枯病菌のエフェクター

白葉枯病菌は、多くのエフェクタータンパク質を持ち、Type III 分泌システムを利用して、イネ細胞内に分泌する。これらのエフェクターは、イネの核に移行して転写因子として機能する Transcription Activator-Like (TAL) エフェクターと、それ以外の Non-TAL エフェクターに分類される。

Non-TAL エフェクターは、多様なたんぱく質であり、イネの細胞内で免疫反応を抑制していると考えられる(Block & Alfano, 2011)。これまでに 20 種類ほどの Non-TAL エフェクターが単離されているが(Furutani *et al.*, 2009)、共通したアミノ酸配列・機能は見いだされていない。私たちの研究室では、Non-TAL エフェクターの XopY がキチン受容体からのシグナル伝達に関わる OsRLCK185, XopP が免疫誘導のポジティブレギュレーターとして働く、E3 ユビキチンリガーである OsPUB44 にそれぞれ結合し、機能を阻害していることを報告している(Yamaguchi *et al.*, 2013; Ishikawa *et al.*, 2014)。

TAL エフェクターは白葉枯病菌日本菌系 I 群菌の XooT7174 に 16 個(Ochiai *et al.*, 2005)、同 III 群菌 XooT7133 にも 16 個(Yoshihisa *et al.*, 2021)同定されている。全ての TAL エフェクターが N 末端に分泌シグナル配列、中央部分に DNA と結合する繰り返し配列、C 末端に核移行シグナルと転写活性化ドメインを持つ。中央部分の 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って構成され、各反復配列の 12 番目と 13 番目のアミノ酸の組み合わせによって、結合する DNA 配列の特異性が決まる。つまり、TAL エフェクターは、この中央部分の反復配列のユニット数と、その 12 番目と 13 番目のアミノ酸が異なるものの、N 末端部分、C 末端部分は非常に高い相同性をもって保存されている。

TAL エフェクターは、イネの特定の遺伝子のプロモーターに結合し、転写を

活性化することで、白葉枯病菌の増殖に寄与していると考えられる。例えば、AvrXa7 や PthXo1 は、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)。OsSWEET14 は細胞膜に局在して糖を細胞外に排出する糖輸送体をコードしており、糖輸送体が蓄積することで、アポプラストで待つ細菌に糖が供給され、栄養源として利用されると考えられる。また、私たちは、Xoo1996 がケイ素の輸送体である OsLsi1 の転写を活性化していることを見出した(未発表)。OsLsi1 は細胞外のケイ素を細胞内へ輸送する(Konishi *et al.*, 2023)。ケイ素は病原菌に対する抵抗性を増大させるという知見もあることから(Van Bockhaven *et al.*, 2015)、細菌が存在するアポプラストから、ケイ素を除去している可能性が考えられる(未発表)。

このような TAL の転写活性化能は、逆にイネによって利用されている。抵抗性遺伝子 Xa7, Xa10, Xa23, Xa27 は、プロモーターに TAL エフェクター結合配列を持っており、TAL エフェクターによって転写が活性化され、感染組織において細胞死を引き起こすことによって、イネに白葉枯病に対する強力な抵抗性を付与している(Gu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2021)。

4. Xa1

発表者は 1998 年に Xa1 をマップベースクローニングによって単離した。Xa1 はイネ品種黄玉が発揮する、白葉枯病菌の日本菌系 1 群菌 T7174 に対する非常に強い抵抗性を担う遺伝子であり、第 4 染色体に座乗する優性遺伝子であることがわかっていた。単離の結果、Xa1 遺伝子は全長 5409 bp で 1802 aa をコードする CC-BED-NB-LRR 型受容体であった(Yoshimura *et al.*, 1998)。イネのプロトプラストに GFP-Xa1 を発現させることにより、Xa1 は核と細胞質に局在することが示された。GFP-CC-BED は核のみで観察されることから、CC-BED ドメインが核局在の活性を持つものと考えられる。T7174 に罹病性を示すイネ品種日本晴の対立遺伝子 *xa1^{mp}* は、Xa1 と比較して LRR の配列は大きく異なるものの、CC-BED-NB ドメインはほとんど同じ配列であった。このことから、当初、Xa1 は LRR ドメインにおいてエフェクターを認識し、CC-BED-NB ドメインは、細胞内で抵抗性カスケードに情報伝達を行うのではないかと予想していた。

2016 年に、Xa1 が認識しているのは TAL エフェクターであること、iTAL エフェクターが Xa1 の抵抗性を妨害することが明らかにされた(Ji *et al.*, 2016)。iTAL エフェクターは TAL エフェクターの N 末端の 58 aa と C 末端の 100~200 aa が欠失した分子である。TAL エフェクターは、イネのプロトプラストでの一過的発現において、当然のことながら、核に局在する。私たちは、イネプロトプラストを用いた BiFC 解析で、Xa1 の CC-BED ドメインが TAL エフェクターの C 末端ドメインと、核で相互作用することを示した。当初予想した LRR は、エフェ

クター認識ドメインではないようである. しかし, 酵母ツーハイブリッド (Y2H) や IP による解析では, Xa1 と TAL エフェクターの直接的な相互作用を確認することはできていない.

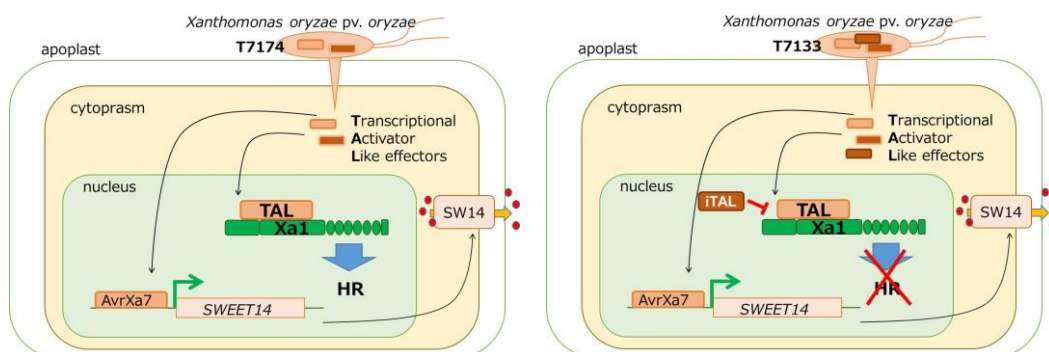


図 1. イネ抵抗性遺伝子 Xa1 と白葉枯病菌の TAL エフェクター・iTAL エフェクターの相互作用による HR の誘導と阻害

5. Xa1 と相互作用する OsERF101

私たちは, Xa1 が TAL エフェクターを認識した後, 細胞内でシグナル伝達に関わる分子を探索するため, CC-BED ドメインをベイトに用いた Y2H を行い, AP2/ERF タイプの転写因子である OsERF101 を単離することができた. OsERF101 は核に局在し, Xa1 と核で相互作用する.

Xa1 を持つイネ品種黄玉において OsERF101 を過剰発現させることにより, Xa1 依存的な *Xoo*T7174 菌に対する抵抗性反応がより強化され, Xa1 が抵抗性を発揮しない *Xoo*T7133 に対する罹病性には全く変化がないことから, ERF101 は Xa1 依存的抵抗性を正に調節していると考えられる. ところが, CRISPR 法による ERF101 ノックアウト植物も, 過剰発現植物と同様に, Xa1 依存的抵抗性がより強化されることがわかった. 今のところ, 私たちは OsERF101 によって強化される経路とは異なる, OsERF101 によって負に制御される, Xa1 依存的な別の抵抗性の経路が存在すると考えている (Yoshihisa *et al.*, 2022).

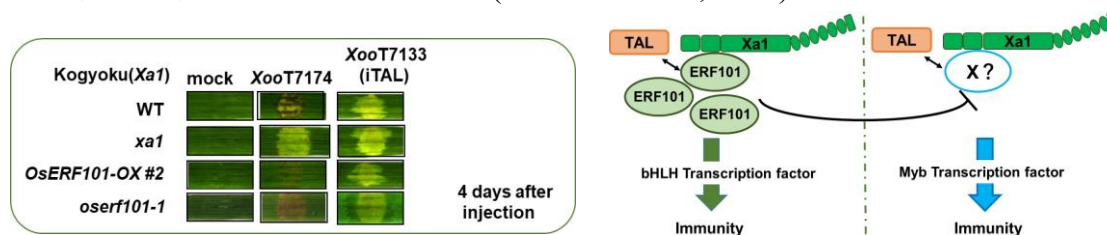


図 2. Xa1 依存的抵抗性発現における OsERF101 の寄与

6. 最後に

近年、クライオ電子顕微鏡により NLR の 3 次元構造が解析され、シロイヌナズナの ZAR1 をはじめ、一部の NLR については、休止状態から、エフェクター認識、次いで抵抗性を発現するまでの NLR の重合、レジストゾーム形成までの様子が知られるようになった(Wang et al., 2019; Kourelis & Adachi, 2022). Xa1 については、その分子量が 200 kDa と非常に大きく、タンパク質の発現、精製が困難であることから、未だ、構造を解析するには至っていない. これまで解析されている CC 型 NLR が細胞膜に局在しているのに対し、Xa1 は核に局在することが特徴的である. これまでに構造が推定されている CC-NLR と同様にオリゴマー化し、核膜において Ca^{2+} チャンネルを形成しているのか、あるいは全く異なる機構によって、抵抗性を誘導しているのか、TAL エフェクターあるいは iTAL エフェクターとどのように相互作用しているのか、OsERF101 はどのように機能しているのか. 解明のため、今後も努力したい.

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援、ご助言をいただきました多くの皆様に感謝いたします. 特に、ミズーリ大学・Bing Yang 教授、京都府立大学・津下誠治教授、岩手生物工学研究センター・清水元樹主任研究員、京都大学・峯彰准教授には多大なるご支援を賜りました. 深謝の意を表します. また、本研究に貢献してくれた川崎研のたくさんの卒業生達に感謝します. 本研究の一部は、科学研究費(19H00945, 24H00515)の助成を受けて行いました.

引用文献

- Antony, G., Zhou, J., Huang, S., Li, T., Liu, B., White, F. and Yang B. (2010) Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *Plant Cell* 22: 3864-3876.
- Block, A. and Alfano, J.R. (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* 14: 39-46.
- Chen, X., Liu, P., Mei, L., He, X., Chen, L., Liu, H., Shen, S., Ji, Z., Zheng, X., Zhang, Y., Gao, Z., Zeng, D., Qian, Q. and Ma, B. (2021) Xa7, a new executor R gene that confers durable and broad-spectrum resistance to bacterial blight disease in rice. *Plant Commun.* 2: 100143.
- 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.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White,

- F.F. and Yin, Z. (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435: 1122-1125.
- Hu, K., Cao, J., Zhang, J., Xia, F., Ke, Y., Zhang, H., Xie, W., Liu, H., Cui, Y., Cao, Y., Sun, X., Xiao, J., Li, X., Zhang, Q. and Wang, S. (2017) Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nat. Plants* 3: 17009.
- Hutin, M., Sabot, F., Ghesquiere, A., Koebnik, R. and Szurek, B. (2015) A knowledge-based molecular screen uncovers a broad-spectrum *OsSWEET14* resistance allele to bacterial blight from wild rice. *Plant J.* 84: 694-703.
- 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.
- Iyer, A.S. and McCouch, S.R. (2004) The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 1348-1354.
- Ji, C., Ji, Z., Liu, B., Cheng, H., Liu, B., Liu, S., Yang, B. and Chen, G. (2020) Xa1 allelic R Genes activate rice blight resistance suppressed by interfering TAL effectors. *Plant Commun.* 1: 100087.
- 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.
- Konishi, N., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N. and Ma, J.F. (2023) Polar localization of a rice silicon transporter requires isoleucine at both C- and N-termini as well as positively charged residues. *Plant Cell* 35: 2232-2250.
- Kourelis J, Adachi H. (2022) Activation and Regulation of NLR Immune Receptor Networks. *Plant Cell Physiol* 63(10): 1366-1377.
- Kumar, A., Kumar, R., Sengupta, D., Das, S.N., Pandey, M.K., Bohra, A., Sharma, N.K., Sinha, P., Sk, H., Ghazi, I.A., Laha, G.S. and Sundaram, R.M. (2020) Deployment of genetic and genomic tools toward Gaining a better understanding of Rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions for development of durable bacterial blight resistant rice. *Front. Plant Sci.* 11: 1152.
- Liu, Q., Yuan, M., Zhou, Y., Li, X., Xiao, J. and Wang, S. (2011) A paralog of the MtN3/saliva family recessively confers race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* in rice. *Plant Cell Environ.* 34: 1958-1969.
- Nino-Liu, D.O., Ronald, P.C. and Bogdanove, A.J. (2006) *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol. Plant Pathol.* 7: 303-324.
- Ochiai, H., Inoue, Y., Takeya, M., Sasaki, A. and Kaku, H. (2005) Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and

- insertion sequences to its race diversity. Jpn. Agric. Res. Quart. 39: 275-287.
- Read, A.C., Rinaldi, F.C., Hutin, M., He, Y.Q., Triplett, L.R. and Bogdanove, A.J. (2016) Suppression of Xo1-mediated disease resistance in rice by a truncated, non-DNA-binding TAL effector of *Xanthomonas oryzae*. Front. Plant Sci. 7: 1516.
- Sakaguchi, S. (1967) Linkage studies on the resistance to bacterial leaf blight *Xanthomonas oryzae* (Uyeda et Ishiyama) DOWSON in rice. Bull. Natl. Inst. Agri. Sci. Ser. D16:1-18.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. and Ronald, P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. Science 270: 1804-1806.
- Tekete, C., Cunnac, S., Doucoure, H., Dembele, M., Keita, I., Sarra, S., Dagno, K., Koita, O. and Verdier, V. (2020) Characterization of new races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Mali informs resistance gene deployment. Phytopathol. 110: 267-277.
- Tian, D., Wang, J., Zeng, X., Gu, K., Qiu, C., Yang, X., Zhou, Z., Goh, M., Luo, Y., Murata-Hori, M., White, F.F. and Yin, Z. (2014) The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. Plant Cell 26: 497-515.
- Van Bockhaven, J., Spichal, L., Novak, O., Strnad, M., Asano, T., Kikuchi, S., Hofte, M. and De Vleeschauwer, D. (2015) Silicon induces resistance to the brown spot fungus *Cochliobolus miyabeanus* by preventing the pathogen from hijacking the rice ethylene pathway. New Phytol. 206: 761-773.
- Wang, C., Zhang, X., Fan, Y., Gao, Y., Zhu, Q., Zheng, C., Qin, T., Li, Y., Che, J., Zhang, M., Yang, B., Liu, Y. and Zhao, K. (2015) XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. Mol. Plant 8: 290-302.
- 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.
- White, F.F. and Yang, B. (2009) Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. Plant Physiol. 150: 1677-1686.
- Xiang, Y., Cao, Y., Xu, C., Li, X. and Wang, S. (2006) Xa3, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as Xa26. Theor. Appl. Genet. 113: 1347-1355.
- 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.

- Yang, Y., Zhou, Y., Sun, J., Liang, W., Chen, X., Wang, X., Zhou, J., Yu, C., Wang, J., Wu, S., Yao, X., Zhou, Y., Zhu, J., Yan, C., Zheng, B. and Chen, J. (2022) Research progress on cloning and function of Xa genes against rice bacterial blight. *Front. Plant Sci.* 13: 847199.
- 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.

土壌微生物叢の力を活かす：農耕地土壌の病害抑止力向上の ための革新的戦略

清水将文

Shimizu, M.

Harnessing the Soil Microbiome: Novel Strategies for Enhancing Disease
Suppressiveness in Agricultural Soils

Abstract

Soil-borne diseases pose a significant threat to global crop production, accounting for 10–20% of annual yield losses. While soil fumigation has been a popular method of controlling soil-borne diseases, particularly in successive monoculture fields, there is a growing need to minimize the use of chemical fumigants due to their harmful effects on human health and the environment worldwide.

All types of natural soils inhabited by microorganisms have greater or lesser suppressiveness to soil-borne pathogens due to combined microbial activity, including niche competition and antagonism among microbes. However, when this suppressiveness is compromised for any reason, such as continuous cropping, changing weather conditions, and improper soil management, the incidence of soil-borne diseases increases. Consequently, soil-borne diseases are referred to as "microbiome diseases."

Developing disease-suppressive soils by manipulating the soil microbiome is an ideal strategy to sustainably control soil-borne diseases. Our laboratory has been investigating the development of a new type of agrochemical capable of transforming disease-conducive soils into disease-suppressive soils by enhancing the disease suppressiveness of the indigenous soil microbiome. Recently, we discovered a unique compound that stimulates indigenous bacterial antagonists and can enhance soil suppressiveness against *Fusarium* wilt.

This review presents different approaches to manipulate the soil microbiome to suppress soil-borne diseases, incorporating our recent research findings.

Keywords: suppressive soil, microbiome, *Fusarium* wilt

岐阜大学応用生物科学部 Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University,
1-1 Yanadigo, Gifu 501-1193, Japan (shimizu.masafumi.f3@f.gifu-u.ac.jp)

1. はじめに

土壌病害は、農作物に甚大な収量損失をもたらしており、その被害は種子伝染性病害や空気伝染性病害を上回る(Yuliar et al., 2015). *Rhizoctonia* 属や *Fusarium* 属, *Verticillium* 属, *Sclerotinia* 属, *Pythium* 属, *Phytophthora* 属などの病原菌は、コムギやトウモロコシ、ワタ、野菜類など多様な農作物に 50~75%の収量損失を引き起こし(Panth et al., 2020), 年間収量損失の 10~20%を占めている(Yuliar et al., 2015). 現状でも、土壌病害は重要な問題であるが、地球温暖化が現在のペースで進行すると、2050 年には土壌病原糸状菌が現在の約 3 倍に増加するとの予測もあり(Delgado-Baquerizo et al., 2020), その被害の深刻化が懸念される。

土壌病害対策の基本は、輪作等による病原菌密度の低減であるが、連作が前提となっている現在の栽培体系では実施が困難である。また、連作圃場は病原菌に重度に汚染されていることも多く、クロールピクリン等の燻蒸剤を用いた土壌消毒が唯一の防除対策となる場合が多い。その一方で、燻蒸剤は毒性が強く、環境負荷も大きいことから、世界的に使用削減が求められている。我が国の「みどりの食料システム戦略」では、2050 年までに化学農薬の 50%削減(リスク換算)が目標として定められているが、この目標を達成するためには土壌燻蒸剤の大幅な使用削減が不可欠であり、代替防除技術の開発が急務となっている。

土壌 1 g には、最大で約 100 億、数千種もの微生物が生息している(Kirubakaran et al., 2020). また、土壌病原菌の感染の場である植物の根圏には、周囲の土壌よりも数百~数千倍も高い密度で微生物が棲みついており、それらの場所で微生物は独特のコミュニティー(微生物叢)を形成している。微生物叢内では、生存に必要な栄養源や定着場所を獲得するため、微生物同士が互いに競合、拮抗あるいは協調しながら共存している(Machado et al., 2021). 土壌病原菌も土壌や根圏の微生物叢の一員であり、その活動や生息密度はそうした微生物間相互作用の影響を受けて変動する。健全な土壌では、他の微生物からの競合・拮抗作用により病原菌の過剰な増殖や活性化は起こりにくいが、連作や環境変化、不適切な土壌管理による微生物叢の攪乱は、病原菌に対する抑止力を低下させ、土壌病害のリスクを高めると考えられている(Wolfgang et al., 2019). そのため、土壌病害の発生を予防するためには、土壌や根圏の微生物叢内で作用している微生物間の競合・拮抗作用を利用し、病原菌に対する抑止力を高めることが重要である。

我われは、土壌の病原菌抑止力を向上させる技術の開発に長年取り組んでいる。そして最近、土着拮抗細菌の集積を促し、萎凋病の発生を抑制する活性をもつユニークな化合物の発見に成功した。本講演では、関連分野の研究動向を交えながら、この研究の経緯と成果について紹介する。

2. 病原菌抑止力の高い微生物叢をもつ発病抑止土壌

病原菌抑止力が高く、土壌病害が発生しない理想的な土壌として、昔から多くの研究者が研究しているのが発病抑止土壌(suppressive soil)である。発病抑止土壌とは、病原菌が土壌中に存在し、かつ発病に適した環境条件であるにもかかわらず、感受性の植物を栽培しても病害が発生しない、または極めて少

ない特殊な土壌である (Schlatter et al., 2017) . これまでに、コムギ立枯病やジャガイモそうか病、ナス科野菜青枯病など、さまざまな病害に対する発病抑止土壌が世界各地で発見されている (Expósito et al., 2017) . 発病抑止土壌の抑止性は、多くの場合、その独特の土壌微生物叢により生み出されていることが明らかとなっている。次世代シーケンシング技術を用いた微生物叢の解析などから、発病抑止土壌は発病助長土壌（一般的な土壌）に比べて微生物の活性や多様性が高い、あるいは、強力な抗菌性物質を産生する *Pseudomonas* 属菌や *Streptomyces* 属菌など特定の拮抗微生物群が集積しており、微生物叢の病原菌抑止力が高いことが示されている (Sagova-Mareckova et al., 2023) . このような発病抑止土壌の特性を人工的に再現できれば、安定的な土壌病害抑制効果が得られるものと期待される。

3. 拮抗微生物を用いたバイオコントロール

バイオコントロールは、強力な拮抗微生物を土壌や根圏に大量投入し、微生物叢内に優占定着させることで病原菌抑止力を高める方法である。特定の拮抗微生物の投入で土壌病害が抑制できることは、100 年以上前の論文 (Hartley, 1921) で既に報告されており、現在まで広範な研究が継続されている。筆者らは、ネギとニラの根圏土壌から、難防除のトマト青枯病に卓効を示す拮抗細菌 *Mitsuaria* sp. TWR114 株および *Ralstonia* sp. TCR112 株を発見した (Marian et al., 218) . これらの拮抗細菌株は、残念ながらまだ実用化には至っていないが、これまでに行われた膨大な数の研究により数多くの優秀な拮抗微生物が発見され、さまざまな菌株が微生物殺菌剤として製品化・上市されている (Lahlali et al., 2022) . 発病抑止土壌から発病抑制の原因微生物を特定し、土壌病害のバイオコントロールに成功した事例も最近報告されている。Zheng et al. (2021) は、青枯病抑止土壌および青枯病助長土壌で栽培したタバコの根圏微生物叢の比較解析および微生物間相互作用のネットワーク解析を通じて、特定の *Pseudomonas* 属菌が青枯病抑止性に寄与していることを明らかにした。さらに、この *Pseudomonas* 属菌を分離し、バイオコントロールエージェントとして用いることで、タバコ青枯病の効果的な防除に成功している。

しかしながら、特定の拮抗微生物を用いたバイオコントロールは、難防除の土壌病害にも防除効果を発揮するなどの利点がある一方で、効果の一貫性に欠けるという課題も存在する。この問題の主な原因は、導入された外来の拮抗微生物が、投入場所の土着微生物叢に馴染めず、十分な密度を維持できないことにある。したがって、拮抗微生物の土壌または根圏における安定的な定着を如何に実現させるかが、重要な研究課題となっている。

そこで近年、複数の微生物株で構成される Synthetic community (SynCom) を用いたバイオコントロールに注目が寄せられている (Zhang et al., 2023) . このアプローチでは、防除メカニズムの異なる拮抗微生物株の組み合わせによる相乗効果や、構成微生物間での機能補完による環境変動や土着微生物叢への適応性の向上といった効果により、さまざまな条件下で安定的な防除効果が得

られると期待されている。実際、SynCom の投入で、単一の拮抗微生物株を投入した場合に比べて高い病害防除効果が得られた事例が多数報告されている (Niu *et al.*, 2020)。筆者らも、上述の拮抗細菌 TWR114 株と TCR112 株の混合投与で、飛躍的に青枯病防除効果が向上することを報告している (Marian *et al.*, 2019)。ただし、数種類の微生物のコンビネーションであっても、予期せぬ微生物同士の相互作用が原因で拮抗微生物の増殖や活動が抑制され、期待した効果が得られない場合が非常に多い。したがって、如何にして最適な微生物構成をデザインするかが今後の課題となっている。

4. 土着微生物叢の病原菌抑止力を高める有機質資材

土着微生物叢内の微生物の活性や多様性を高める、あるいは微生物叢内に存在する拮抗微生物の生息密度を高めることで、発病抑止土壤に類似した土壤環境を創出しようとするアプローチも試みられている。外来の拮抗微生物を導入する従来のバイオコントロールとは異なり、その土地の土着微生物叢を利用することから、安定した病害抑制効果が期待される。その方法の一つに有機質資材の施用がある。有機質資材は従来から土壤改良に用いられてきたが、近年の有機農業推進の潮流の中で再評価されている。

有機質資材の中には、土壤病害を効果的に抑制する効果を示すものが存在する。代表的な例としては、キチン質資材（カニ殻やエビ殻など）が挙げられる。キチン質資材を施用すると、キチン分解活性をもつ *Streptomyces* 属菌や *Lysobacter* 属菌などが土壤中で増加する (Iwasaki *et al.*, 2020)。その結果、細胞壁の主要構成成分にキチンを含む病原糸状菌が溶菌され、*Fusarium* 病や *Verticillium* 病の発生が抑制される (Cretoiu *et al.*, 2013)。

コンポストの施用による土壤病害抑制効果も広く報告されている。ある種のコンポストの施用で *Fusarium oxysporum* や *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Phytophthora*, *Pythium* などを原因とするさまざまな土壤病害が抑制されたことが報告されている (De Corato, 2020)。例えば、尤・東條 (2020) は、モウソウチクから作成したミミズコンポストの施用でキュウリ苗立枯病を効果的に抑制できたことを報告している。コンポスト施用による病害抑制のメカニズムは複数存在し、1) コンポスト中の有機物を栄養源とする微生物の増殖に伴う競合作用の増高、2) コンポスト内に存在する拮抗微生物による直接的な病原菌の抑制、3) コンポスト微生物による土着微生物叢の変化を介した間接的な病原菌抑制、などが挙げられる。

最近では、植物残渣の利用による病害抑制効果も注目されており、パイナップル残渣の鋤き込みによるバナナ萎凋病の抑制 (Yuan *et al.*, 2021) や稲わらの鋤き込みによるチンゲンサイ根こぶ病の抑制 (Han *et al.*, 2021) など、新たな知見が報告されている。いずれも土壤微生物叢の変化が病害抑制の直接的原因であることが証明されている。

これらの知見は、特定の有機質資材の施用が土壤病害抑制に有効であることを示している。しかし、資材の種類や製品、製品ロットの違いにより、効果が

異なる場合がある．場合によっては効果がないだけでなく，発病を助長することもあるため（Bonamomi *et al.*, 2007），投入する資材の選定には慎重を期す必要がある．

5. 土着微生物叢の病原菌抑止力を高める化合物

化合物の施用で土着微生物叢を改変し，病原菌抑止力を高めて土壤病害を抑制する研究も進められている．Posas *et al.*（2007）は，数種類の単糖やアミノ酸を炭素源として投与し，トマト青枯病に対する土壤の抑止性が向上するかを検討した．その結果，グルコースやプロリン，グルタミン，セリン，アルギニン，リジンの投与で土壤の微生物活性が顕著に高まり，青枯病の発生を軽減できることを明らかにした．同様に，Shimizu *et al.*（2018）も単糖の施用によるセンサイ立枯病抑止効果を調査し，グルコースやフルクトース，ソルボース，キシロースの施用に発病抑制効果を認めたことを報告している．また，糖やアミノ酸のような低分子化合物だけでなく，高分子化合物にも同様の効果を示すものがある．例えば，フミン酸やフミン酸ナトリウムの施用で，キュウリつる割病に対する抑止性が向上することが報告されている（Jiang *et al.*, 2022）．これらは難分解性の高分子有機酸であるが，一部のファーミキューテス門やプランクトミケス門の細菌がこれら化合物を栄養源として増殖し，その結果として競合作用が強まり，*F. oxysporum* の増殖が制限され，発病が抑制されるようである．

最近の研究から，植物は根分泌物を介して，自身の生存や成長に有利に働く拮抗微生物などの有益な微生物を根圏に集積させていることが明らかとなってきた（Park *et al.*, 2023）．このことから，根分泌物に含まれる有益微生物の集積を誘導する原因物質を特定すれば，病害抑制や植物生育促進など，目的に合わせた土着微生物叢の改変を可能にする農薬が開発できると考えられる．実際，Wen *et al.*（2023）は，病害に感染した植物個体と健全個体とでは根圏微生物叢が異なる点に着目した研究から，微生物叢の病原菌抑止性を向上させる化合物を特定した．彼らは，青枯病発生圃場から健全トマト個体と罹病トマト個体を採取し，根分泌物の成分組成を比較した．これにより，健全個体の根分泌物中に豊富に含まれる11成分を選定した．つぎに，それらのうち青枯病菌が栄養源としてほとんど利用することのできない7成分（リボース，乳酸，キシロース，マンノース，マルトース，グルコノラクトン，リビトール）を選び，土壤に混合投与し，青枯病に対する影響を調査した．その結果，ある種の常在微生物群の多様性が高まり，トマト青枯病が顕著に抑制されたことから，この化合物カクテルを土壤病害防除のためのプレバイオティクス（有用微生物を活性化・増加させる薬剤）として利用できる可能性があるとして述べている．

筆者らは，伝統農法であるネギ類の混植・輪作に関する研究から，萎凋病に対する抑止性を誘導する作用をもつ化合物を発見した．ネギやタマネギ，ニラなどのネギ類をウリ科野菜と混植あるいは輪作すると，*F. oxysporum* によるウリ類つる割病（萎凋病の一種）の発生が抑制されることが昔から知られていた

(木嶋, 2011) . さらに, ネギ類の混植・輪作は, ウリ科以外の作物の萎凋病にも効果があることが近年相次いで報告された (Huang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013) . 筆者らも, ネギおよびニラとホウレンソウの混植栽培試験を行い, 萎凋病が顕著に抑制されることを確認した (五十嵐ら, 2017) . 約 35 年前に行われた研究から, ネギ類の混植・輪作の萎凋病抑制効果は, ネギ類の根圏に生息する拮抗細菌が原因である可能性が指摘されていた (浅川, 1992; 有江ら, 1987) . 筆者らは, この説が正しいならば, ネギ類は土着の拮抗細菌を増殖させる何らかの化合物を産生している可能性があると考えた. そこでまず, ネギ類の輪作・混植の萎凋病抑制効果と拮抗細菌の関連性を調査した. その結果, ネギ類を栽培すると土壤中で *Flavobacterium* 属や *Pseudomonas* 属が顕著に増殖し, それらが病原菌の増殖と感染を阻害することで, 萎凋病の発病を抑制していることが明らかとなった (Nishioka *et al.*, 2016, 2019) . つぎに, ネギ類がこれらの拮抗細菌を土壤に集積させるメカニズムについて解析した. 上述のとおり, 拮抗細菌の集積は, ネギ類が産生する化合物に起因すると予想されたことから, ネギ類の根から水溶性成分を抽出し, その成分分析を行うとともに, 検出された成分を土壤に投与して萎凋病抑止性を誘導する活性を評価した. その結果, ネギ類が特徴的に合成するジペプチドである γ -グルタミル-S-アリルシステイン (GSAC) に顕著な萎凋病抑制活性があることを発見した (Nishioka *et al.*, 2022) . GSAC とは別のジペプチド 3 種類を投与する処理区も設けたが, いずれの区でも発病は抑制されなかったことから, この活性は GSAC 特有のものであることが明らかとなった. GSAC を投与した土質の異なる 2 種類の土壤の細菌叢を 16S rRNA アンプリコンシーケンスで解析したところ, 共通して 3 種類の細菌群が増殖していることが判明した. 興味深いことに, そのうちの 1 種類は, ネギの根圏で増殖する *Pseudomonas* 属と同一系統 (*Pseudomonas fluorescens* complex) の菌種であった. ネギの根圏から分離した *Pseudomonas* 属菌株を, GSAC 投与土壤に集積する菌種とそれ以外の菌種に分け, キュウリつる割病に対する抑止性を比較した結果, 前者の菌種の方が強い抑止活性を示した. このことから, GSAC は, 土着の拮抗細菌である *P. fluorescens* complex の集積を誘導し, 発病助長土壤を萎凋病抑止土壤に変えることのできる化合物であると結論づけた.

現在, この発見を基に, 発病抑止土壤の人工作出を可能にする次世代型の農薬の開発に向けて引き続き研究を重ねている.

おわりに

土壤あるいは根圏の微生物叢の状態が土壤病害の発生と密接に関わっているであろうことは昔からいわれていたが, 次世代シーケンシングなど新しい解析技術の登場で, その関連性の詳細が徐々に紐解かれ始めている. どのような微生物叢の変化が土壤病害を助長するか, つまり不健康な微生物叢とは何か, については未だ判然としない部分が多いものの, 病害抑止的な健全な微生物叢に関してはさまざまなことが明らかとなってきた. それらの最新の知見を活

かすことで、本総説で紹介したような微生物叢改善技術がさらに進化し、防除困難な土壌病害への対策として広く利用される日が来ることを期待したい。同時に、この技術の発展が、持続可能な農業システムの構築や、より広範な生態系の健全性維持に貢献することを願っている。今後は、学際的なアプローチと産学連携をさらに推進し、基礎研究の成果を実用化につなげていくことが重要であろう。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費助成事業（24780317 および 22H02344）の支援を受けて実施した。

引用文献

- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C. and Scala, F. (2007) Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *J. Plant Pathol.* 89:311-324.
- Cretoiu, M.S., Korthals, G.W., Visser, J.H. and van Elsas, J.D. (2013) Chitin amendment increases soil suppressiveness toward plant pathogens and modulates the actinobacterial and oxalobacteraceal communities in an experimental agricultural field. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:5291-301
- De Corato, U. (2020) Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. *Rhizosphere* 13: 100192
- Delgado-Baquerizo, M., Guerra, C.A., Cano-Díaz, C., Egidi, E., Wang, J.T., Eisenhauer, N., Singh, B.K. and Maestre, F.T. (2020) The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale. *Nat. Clim. Change* 10:550-554.
- Expósito, R.G., de Bruijn, I., Postma, J. and Raaijmakers, J.M. (2017) Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Front. Microbiol.* 8:2529
- Han, Z., Di, C., Rahman, M.K.u., Gao, D., Wu, F. and Pan, K. (2021) Repeated application of rice straw stabilizes soil bacterial community composition and inhibits clubroot disease. *Agriculture* 11:108.
- Hartley, C. (1921) Damping-off in forest nurseries. *Bull. U.S. Dep. Agric.* 934:1-99.
- Huang, Y.H., Wang, R.C., Li, C.H., Zuo, C.W., Wei, Y.R., Zhang, L. and Yi, G.J. (2012) Control of *Fusarium* wilt in banana with Chinese leek. *Eur. J. Plant Pathol.* 134:87-95.
- Iwasaki, Y., Ichino, T. and Saito, A. (2020) Transition of the bacterial community and culturable chitinolytic bacteria in chitin-treated upland soil: From *Streptomyces* to Methionine-auxotrophic *Lysobacter* and Other Genera.

- Microbes Environ. 35:ME19070.
- Jiang, N., Wu, M., Li, G., Petropoulos, E., Sun, F., Wang, X., Liu, J., Liu, M. and Li, Z. (2022) Humic substances suppress *Fusarium oxysporum* by regulating soil microbial community in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Appl. Soil Ecol. 174:104389.
- 木嶋利男 (2011) ネギ属植物の間・混作による作物病害の防除. 雑草研究 56:14-18.
- Kirubakaran, R., ArulJothi, K.N., Revathi, S., Shameem, N. and Pararay, J.A. (2020). Emerging priorities for microbial metagenome research. Bioresour. Technol. Rep. 11, 100485
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z. and Barka, E.A. (2022) Biological control of plant pathogens: A global perspective. Microorganisms 10:596.
- Liu, S., Wu, F. and Wen, X. (2013) Allelopathic effects of root exudates of Chinese onion on tomato growth and the pathogen *Fusarium oxysporum* (Sch1) f. sp. *lycopersici*. Allelopath. J. 31:387-404.
- Machado, D., Maistrenko, O.M., Andrejev, S., Kim, Y., Bork, P., Patil, K. R. and Patil, K.R. (2021) Polarization of microbial communities between competitive and cooperative metabolism. Nat. Ecol. Evol. 5:195-203.
- Marian, M., Nishioka, T., Koyama, H., Suga, H. and Shimizu, M. (2018) Biocontrol potential of *Ralstonia* sp. TCR112 and *Mitsuaria* sp. TWR114 against tomato bacterial wilt. Appl. Soil Ecol. 128:71-80.
- Nishioka, T., Suga, H. and Shimizu, M. (2022) The stimulation of indigenous bacterial antagonists by gamma-glutamyl-S-allyl-L-cysteine increases soil suppressiveness to Fusarium Wilt. Appl. Environ. Microbiol. 88: e0155422.
- Nishioka, T., Suzuki, Y., Suga, H., Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Hyakumachi, M. and Shimizu, M. (2016) Metagenomic analysis of bacterial flora in rhizospheres of *Allium* plants and suppressive activity of *Pseudomonas* isolates against Fusarium wilt of cucumber. IOBC-WPRS Bull. 115:107-111.
- Nishioka, T., Marian, M., Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Tamaki, H., Suga, H. and Shimizu, M. (2019) Microbial basis of Fusarium wilt suppression by *Allium* cultivation. Sci. Rep. 9:1715.
- Niu, B., Wang, W., Yuan, Z., Sederoff, R.R., Sederoff, H., Chiang, V.L. and Borriss, R. (2020) Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. Front. Microbiol. 11:585404.
- Panth, M., Hassler, S.C., Baysal-Gurel, F. (2020) Methods for Management of Soilborne Diseases in Crop Production. Agriculture 10:16.
- Park, I., Seo, Y.S. and Manna, M. (2023) Recruitment of the rhizo-microbiome army: Assembly determinants and engineering of the rhizosphere microbiome as a key to unlocking plant potential. Front. Microbiol. 14:1163832.

- Sagova-Mareckova, M., Omelka, M. and Kopecky, J. (2023) The golden goal of soil management: Disease-suppressive soils. *Phytopathology* 4:741-752.
- Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D. and Paulitz, T. (2017) Disease suppressive soils: New insights from the soil microbiome. *Phytopathology* 11:1284-1297
- Shimizu, Y., Sagiya, D., Matsui, M. and Fukui, R. (2018) Zonal soil amendment with simple sugars to elevate soil C/N ratios as an alternative disease management Strategy for *Rhizoctonia* damping-off of sugar beet. *Plant Dis.* 102:1434-1444.
- 尤 曉東, 東條元昭 (2020) モウソウチク由来ミミズ堆肥中の土壤微生物と植物病害発病抑制効果. *土と微生物* 74:50-53.
- Yuan, X., Hong, S., Xiong, W., Raza, W., Shen, Z., Wang, B., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q. and Dini-Andreote, F. (2021) Development of fungal-mediated soil suppressiveness against *Fusarium* wilt disease via plant residue manipulation. *Microbiome* 9:200.
- Yuliar, Nion, Y.A. and Koki, T. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 30:1-11.
- Wen, T., Xie, P., Liu, H., Liu, T., Zhao, M., Yang, S., Niu, G., Hale, L., Singh, B.K., Kowalchuk, G.A., Shen, Q. and Yuan, J. (2023) Tapping the rhizosphere metabolites for the prebiotic control of soil-borne bacterial wilt disease. *Nat. Commun.* 14:4497.
- Wolfgang, A., Taffner, J., Guimarães, R.A., Coyne, D. and Berg, G. (2019) Novel strategies for soil-Borne diseases: Exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms toward controlling *Meloidogyne*-based disease complexes. *Front. Microbiol.* (2019): 1296.
- Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao, Y., Shen, Q. and Zhang, R. (2023) Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. *Microb. Biotechnol.* 16:2250-2263.
- Zheng, Y., Han, X., Zhao, D., Wei, K., Yuan, Y., Li, Y., Liu, M. and Zhang, C.S. (2021) Exploring biocontrol agents from microbial keystone taxa associated to suppressive soil: A new attempt for a biocontrol strategy. *Front. Plant Sci.* 12:655673

持続的農業生産における土壌病害の予防的管理の意義

吉田 重信*

Yoshida, S.*

Significance of preventive management against soil-borne disease in sustainable agriculture

Abstract

Soil-borne diseases have been recognized to cause significant negative impacts on crop production. Although most farmers have been using chemicals such as soil fumigants to disinfest the field soils before scheduled planting against the diseases because of the difficulty of control once the disease occurred during cultivation in the fields, such conventional applications often cause an excess use of the chemicals, thereby increasing disease control costs and inhibiting agricultural sustainability and environmental conservation. To avoid the unnecessary use of chemicals for disease management, it is necessary to diagnose and assess the disease-occurrence potential before planting in each field and take appropriate control measures based on the potential degree. Since such decision-making system is based on health check-up system in preventive medicine, we named the system as the Health checkup-based Soil-borne Disease Management (HeSoDiM). HeSoDiM is a promising strategy to realize sustainable agriculture by decreasing input of costs and environmental stresses to arable lands, and necessary to be more propagated through further research and development on this soil-borne disease management system. This paper introduces the outline of the necessity of preventive management against soil-borne disease, contents of HeSoDiM and artificial intelligence assisting HeSoDiM practice recently developed, as well as discussing future perspectives for the propagation of HeSoDiM.

Key words: Artificial intelligence, HeSoDiM, HeSo+, Soil-borne disease,

農研機構植物防疫研究部門 作物病虫害防除研究領域 Division of Crop Pest Control Research, Institute for Plant Protection, NARO (*Corresponding author: yoshige@affrc.go.jp)

1. はじめに

土壤伝染性病害（土壤病害）は、土壤中に生息する病原菌によって作目の地下部が侵され、病原菌の種類によっては、さらに地上部の茎葉まで侵される病害（駒田，1998）として知られており、過去に実施されたアンケート調査結果によれば、圃場で生じる連作障害の原因の主要因になっているとされている（駒田，1988）。一般に、土壤病害は防除が難しく、経済的損失額の大きな被害を及ぼすとされるが、さらに近年では、農業者の高齢化・減少に伴い、土壤病害の発生が耕作放棄のきっかけとなってしまう場合もある。このため、産地や圃場の持続的生産の維持向上のためには、土壤病害対策がより重要となっているといえる。土壤病害は、栽培途中に一旦発生してしまうと、その後の対策が基本的には困難になることから、予防的に防除・管理することが必要であるが、その予防的管理のためには、圃場での土壤病害の発病ポテンシャルを予め診断・評価し、防除の必要性の判断やポテンシャルのレベルに応じた適切な対策を講じる戦略が有効である。筆者らは、予防医学の中の取組として行われるヒトの一般定期健康診断に基づく健康管理を参考に、こうした土壤病害管理の戦略を実践するための「診断」・「評価」・「対策」からなるフレームワークを考案し、「健康診断の発想に基づく土壤病害管理」の英語表現（Health checkup based Soil-borne Disease Management）の頭文字を取り「ヘソディム（HeSoDiM）」と命名した（一般財団法人日本土壤協会，2020；Tsushima and Yoshida, 2012; Yoshida and Tsushima, 2020）。ヘソディムは、土壤病害の予防的管理や効率的な防除に役立ち、農地の持続的利用や生産者の収益性の向上に貢献することが期待できる管理法である。本稿では、土壤病害に対する予防的管理の必要性、ヘソディムおよびヘソディム普及のために開発されたAIツール「HeSo+：ヘソプラス」について概説するとともに、ヘソディムの普及のための今後の課題等についての私見を述べたい。

2. 土壤病害に対する予防的管理の必要性

土壤病害は、圃場での栽培期間中に一旦発生するとその後の対策が一般には困難となる。病害の種類によっては栽培途中の対策が可能なものもあるが、その場合でも病害発生に伴う減収に加え防除に要する労力や費用がかさみ、農業者の収益に大きなダメージを与えてしまう。このため、生産現場では最悪の事態を回避するための予防的措置として、懸念される病害に対して有効な土壤消毒剤などの化学農薬を防除暦に基づいて管理圃場に画一的に使用する防除（カレンダー防除）が行われることが多い。しかし、こうした画一的な使用による予防的管理では、消毒剤を使わなくてもよいと考えられる圃場にも使用してしまう場合があり、結果的に過剰な作業労力や農薬代などが生じ、非効率的な防除が行われてしまうこととなる。また、近年の施策的な動きとして、作業者の健康や周辺環境への影響などの観点から化学農薬の使用を制限する動きが国際的に進んでおり、我が国では農林水産省によって2021年5月に策定された「みどりの食料システム戦略」において「化学農薬使用量（リスク換算）の50%低減」が2050年までに目指す姿のKPI（重要業績評価指標）として設定されている（農林水産省，2021）。農薬全体の使用量をリスク換算で見た場合には、土壤病害対策に使用される土壤くん蒸剤の占める割合が大きくなるため、その使用への風当たりが今後一層強まることが予想される。さらに、2018年に改正された農薬取締法に基づき2021年から開始された農薬の再評価制度により、現場で利用可能な農薬の選択肢が減ることが懸念されており（横田，2023）、その余波を受け土壤消毒剤が今後利

用しにくくなる状況となってしまう可能性も否めない。こうした施策的なニーズや背景も踏まえると、土壌消毒剤を効率的に利用する方策を講じることは喫緊の課題であるといえよう。

土壌消毒剤の効率的な利用を図るためには、まずは土壌消毒や防除が必要な圃場や場면을明らかにしたうえで、必要と判断された場所や場面で使用して病害の予防的管理をする戦略を実行することが有効かつ重要であり、これにより生産コストや農耕地の環境負荷の低減が図られ、持続的農業の推進にもつながる。筆者らは、こうした予防的な病害管理を、一般定期健康診断に基づくヒトの健康管理が参考になると考えた。一般定期健康診断は、血圧や血糖値などの基本的項目の診断と問診に基づき自身の健康状態を把握して、健康維持や疾患の予防・早期発見に役立てるために行われるものであり、結果的に疾患に伴う長期入院・長期治療およびこれらに伴う高額な費用負担を回避することにつながる。同じように、その圃場の土壌病害の発生しやすさの程度（すなわち、防除が必要な状態かどうか）を診断して、その状態に応じて対策を講じることで、土壌消毒剤の過剰な利用コストを避けつつ病害の発生やまん延を回避することができ、圃場の持続的利用に役立てられることが期待できる。筆者らは、この土壌病害の予防的管理法を、一般定期健康診断による健康管理にちなんでいることから、「健康診断の発想に基づく土壌病害管理法」の英語表現（Health checkup based Soil-borne Disease Management）の頭文字を取って、「ヘソディム（HeSoDiM）」と呼称した（一般財団法人日本土壌協会，2020；Tsushima and Yoshida, 2012; Yoshida and Tsushima, 2020）。

3. ヘソディムの開発および期待される効果

上述のとおり、ヘソディムは一般定期健康診断による健康管理のフローを参考に開発されており、「診断」・「評価」・「対策」の3つの要素で構成されたフレームワークである（図1）。

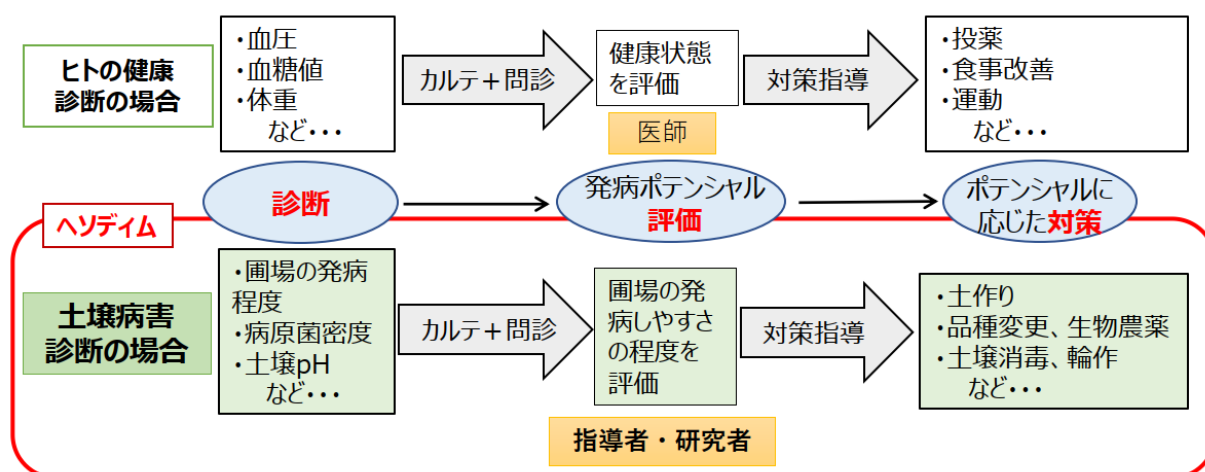


図1. ヘソディムのフレームワーク

「診断」では、病害ごとに前作の発病度、土壌の生物性（ここでは、土壌中の病原微生物の定性定量情報や土壌微生物相を示す）や土壌の理化学性、各種圃場環境のデータなどから、その病害に適した診断項目を選び、診断項目ごとに基準を設定し、診断票を作成する。次に「評価」では、診断票に記入された結果と栽培管理などの聞き取りを踏まえて、

総合的な圃場の土壌病害の発生しやすさの程度（病害発生ポテンシャルレベル）を原則 3 段階で評価する（ポテンシャルが低い場合：レベル 1, 中程度の場合：レベル 2, 高い場合：レベル 3 など）。最後の「対策」では、指導者は対象病害ごとに対策技術をリスト化して、生産者と一緒に適切な対策方法を検討する。例えば、レベル 1 であった場合は、土づくりによる発病抑止土壌の活用、レベル 2 であった場合は、生物農薬や病害抵抗性品種の利用、レベル 3 であった場合は、土壌消毒剤の処理を行う、などのポテンシャルレベルに応じた対策法を指導者は提案する。ここでは、ヒトの健康診断で「医者」と「受診者」が面談して食生活の改善や運動、投薬などの対処方針を決めるように、「指導者」と「生産者」が評価結果に基づいてお互い納得した上で対処方針の決定を行うことが大切である。このようにして、診断に基づく対策を毎作繰り返しながら行い、各要素（診断項目や基準、評価方法やレベルごとの対策技術など）を病害ごとに最適化していくことで、その圃場により適合したヘソディムを構築することができるようになり、効果が期待できない「ムリ」な対策を避けつつ、過剰な土壌消毒剤使用が回避できるなどの様々なコストの「ムダ」がない効率的な土壌病害管理が可能になる。

ヘソディムは、過剰な土壌消毒剤使用の回避だけでなく、その実践により既存の対策技術の効果的活用などにも役立てられる。例えば、病害の生物的防除に用いられる微生物農薬は、基本的には「生き物」であるため、そのマイルドな作用性などにより特に難防除の土壌病害に対しては効果が出にくいと考えられている。その一方で、日本植物防疫協会を取りまとめている新農薬実用化試験の成績やこれまでの研究知見などに基づく、土壌病害の発生程度が低い圃場条件や接種圧が低い試験条件下においては、微生物農薬が安定的な防除効果を発揮している傾向があり、土壌病害の発生程度（発病ポテンシャル）が低いと考えられる圃場の状況下といった「効果が期待できる場面」での使用では、微生物農薬の能力（防除効果）が有効に発揮されることが期待できる。すなわち、微生物農薬の利用を発病ポテンシャルレベルが低い圃場向けの対策技術としてヘソディムの中に位置づけることで、安定的な防除効果が期待できる対策技術の一つとして活用できるようになる。また、ヘソディムの活用場面は、すでに土壌病害が激発し被害が深刻となっている生産現場にもある。病害が激発した産地では、まずはそのまん延防止や産地での生産回復のために土壌消毒剤の積極的な使用や休耕・輪作などによる徹底防除が必要となるが、その後発生がある程度収束し始めた時点において、徹底防除をいつまで継続する必要があるかの見極めが生産現場での課題となっている。こうした場面で、ヘソディムのフレームワークに当てはめて次作の栽培前に圃場の発病ポテンシャルレベルを診断することで、次作の徹底防除の要否や休耕後の作付け再開可否の意思決定に役立てられることが期待できる。

以上のように、さまざまな場面での活用が可能なヘソディムは、基本的には異なる主因や素因に対応するために作物病害ごとに開発していく必要がある。筆者らは、これまでに全国の公設試験研究機関や民間企業等と共同で主要な土壌病害を対象にヘソディムの開発を行い、指導者向けのマニュアルを作成・公開してきた。すなわち、農林水産省のプロジェクト研究「土壌病害虫診断技術等の開発」（2011 ～ 2013 年度）において、トマト青枯病、ショウガ根茎腐敗病、レタス根腐病、ダイズ茎疫病、アブラナ科野菜根こぶ病、ブロッコリー根こぶ病およびキャベツ根こぶ病を対象に開発し、指導者向けのマニュアルを作成した（農業環境技術研究所, 2013）（図 2）。その後、農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業「次世代型土壌病害診断・対策支援技術の開発」（2013～2015 年度）におい

て、ショウガ根茎腐敗病、キャベツバーティシリウム萎凋病、ネギ黒腐菌核病、セルリー萎黄病、ハクサイ黄化病、レタスビッグベイン病、レタス菌核病、イチゴ炭疽病・萎黄病、ジャガイモそうか病などを対象に開発、マニュアル化した（農業環境技術研究所，2016）（図2）。

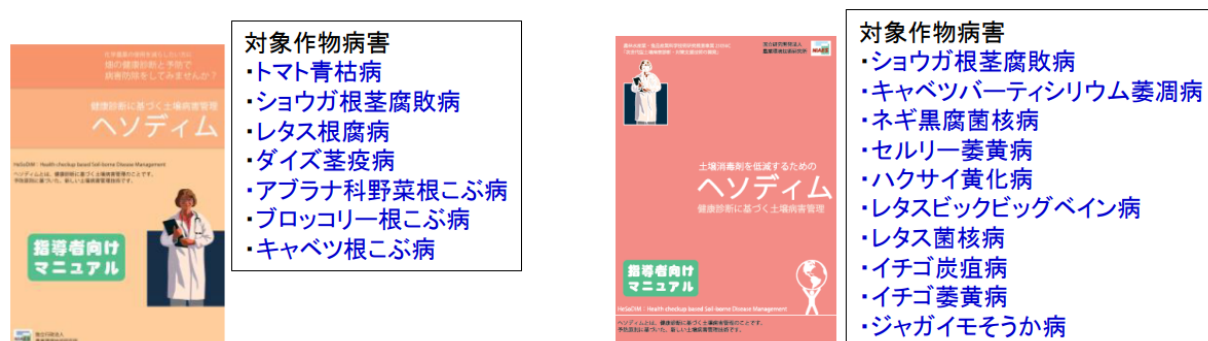


図2. 2013年（左）、2016年（右）に作成されたマニュアルの表紙およびそれぞれで掲載している対象作物病害

さらに、今日までに全国の各種病害に対する新たなヘソディムまたはヘソディムのフレームワークに基づく病害管理法が多くの公設試験研究機関などにより開発され、マニュアル化されている（鹿児島県農業開発総合センター，2019；熊本県農業研究センター生産環境研究所，2023；桃井，2015a,b；西脇，2022；農研機構中央農業研究センター，2020；富山県農業研究所病理昆虫課，2023）。これらの作成したマニュアルの有効性を現地で実証した結果では、ハクサイ根こぶ病に対して薬剤の使用削減（防除コスト削減）の効果（ウェルシード・農研機構近畿中国四国農業研究センター，2016）や、キャベツバーティシリウム萎凋病に対して産地内の9割以上の圃場で本病の発生を5%以下に抑えられる効果などが得られており（群馬県農業技術センター，2016），ヘソディムの実践による実際の病害管理上の有効性が確認されている。また，民間の農薬メーカーでは，自社の農薬の効果的活用を図る目的でヘソディムの概念を採用し，普及に役立てる取り組みも行われている（美野，2014）。このように，ヘソディムはコストの観点も加味した土壤病害の効率的な管理に役立つものであり，その普及を図ることが，国内の安定的な農業生産の推進にも貢献すると考える。

4. より広域にヘソディムを実践するためのAI ツール「HeSo+（ヘソプラス）」の開発

前項で述べた主要な土壤病害を対象とした指導者向けの各マニュアルは，ヘソディムの普及に役立ててもらうために作成されたものである。しかし，これらは，限られた産地または圃場の栽培条件下での試験結果を基に作成されたものであるため，圃場環境や栽培条件が異なる圃場でヘソディムを実践する場合には，作成したマニュアルをベースに，指導者らが中心となって実際の診断対象圃場の条件に応じて臨機にマニュアルの内容を改変して取り組んでもらう必要がある。ところが，近年，特に熟練の指導者が減少しており，マニュアルの改変やそれに基づいた指導も行われにくい状況になっていることが，ヘソディムの普及上の課題となっていた。

このため，多くの圃場でヘソディムによる土壤病害管理を実践してもらうためには，圃場環境や栽培条件に応じて最適な発病ポテンシャルの診断等が簡便に行える新たなシステ

ム作りが必要であり、具体的には、各圃場の条件に適した圃場の発病ポテンシャルの診断および対策を支援する技術の開発や、指導者による診断・対策支援をサポートできる仕組み作りが必要であると考えた。これらの課題を解決するアプローチとして、筆者らはAI（人工知能）を活用したデータマイニングによる診断・対策支援技術の開発が有効と考え、農林水産省の支援を受け、13の公設試験研究機関、1大学および民間企業3社と共同でプロジェクト研究「AIを活用した土壌病害診断技術の開発（2017～2021年度）」に取り組むこととした。プロジェクト研究では、現地での被害が問題となっている主要な土壌病害のアブラナ科野菜（キャベツ、ブロッコリー、ナバナ）根こぶ病、ネギ黒腐菌核病、バーティシリウム病害（ハクサイ黄化病、キク半身萎凋病）、卵菌類病害（タマネギべと病、ショウガ根茎腐敗病）、トマトおよびショウガ青枯病を対象に、精度よく圃場の発病ポテンシャルを診断できるAIを開発するとともに、AIを活用した診断・対策支援システムを構築することを目標とした。一般に精度の高いAIを開発する上で、用いるデータの量と質の確保はその成否のための重要な要件とされている。そこで本研究では、可能な限り地域や栽培体系が多様な圃場条件下で多くの実証データを収集できるよう、プロジェクト参画機関が既存のマニュアルの内容を基本に各対象圃場の栽培条件に合わせて改変したヘソディムの現地実証を繰り返し行い、その過程で得られる耕種概要情報、土壌の生物性および理化学性等の各種データをデータセットとして整理し、機械学習用データとして用いた。

また、開発したAIを利用するための仕組み作りとして、AIで導出される対象圃場に適した発病ポテンシャルの診断項目（診断方法）、発病ポテンシャル診断結果および発病ポテンシャルに応じた対策技術をユーザーに分かりやすく提示できるインターフェースの開発を行った。さらに、ヘソディムの生産現場での普及を拡大するためには、多くの潜在的ステークホルダーに本インターフェースを利用してもらう必要があり、特に営農指導に携わる民間企業等によるインターフェースを用いた診断・対策支援サービスの事業化につなげることを目指し、その実現のためのビジネスモデルの構築にも取り組んだ。

以上の研究開発を参画メンバーとともに進めた結果、上記の10種の作物病害に対する圃場の発病ポテンシャルを診断し、診断結果に応じた対策を支援できるAIアプリ「HeSo+（ヘソプラス）」を開発した（吉田，2023）。

HeSo+では、発病ポテンシャルを診断する対象圃場をマップ上から選定するとともに診断対象の病害を指定すると、その圃場に適した発病ポテンシャル診断項目が提示される（図3）。入力する診断項目には、土壌の分類群、pHなどの土壌理化学性情報の他に、前作や周辺圃場での対象病害の発生程度、土壌中の病原菌密度などがあり、それらの中から対象病害や圃場に適した項目が提示されるようになっている。提示された項目に対して実際のデータを入力すると、対象圃場における発病ポテンシャルが3段階のレベル（低：レベル1～高：レベル3）が診断結果として示され、マップ上でも色分けでポテンシャルレベルが識別できるようになっている。また、各発病ポテンシャルレベルに対応した対策技術も提示されるようになっており、その際には、ユーザーの志向性や目指すゴール（①例年通りの収量確保を最優先とする場合、②増収増益を最優先とする場合、③生産物の高付加価値化を最優先とする場合、④圃場の持続的利用を最優先とする場合）別に最適な手段を

提示するようになっている。さらに、HeSo+の診断結果に基づき、実際に行った病害管理の結果を入力するフォローアップ機能が実装されており、これらのデータを学習用データとして利用し、AIの性能を向上することができる設計となっている。HeSo+のその他の機能として、圃場で発生した病害の症状の写真撮影機能や病害発生箇所の記録機能なども付属している。

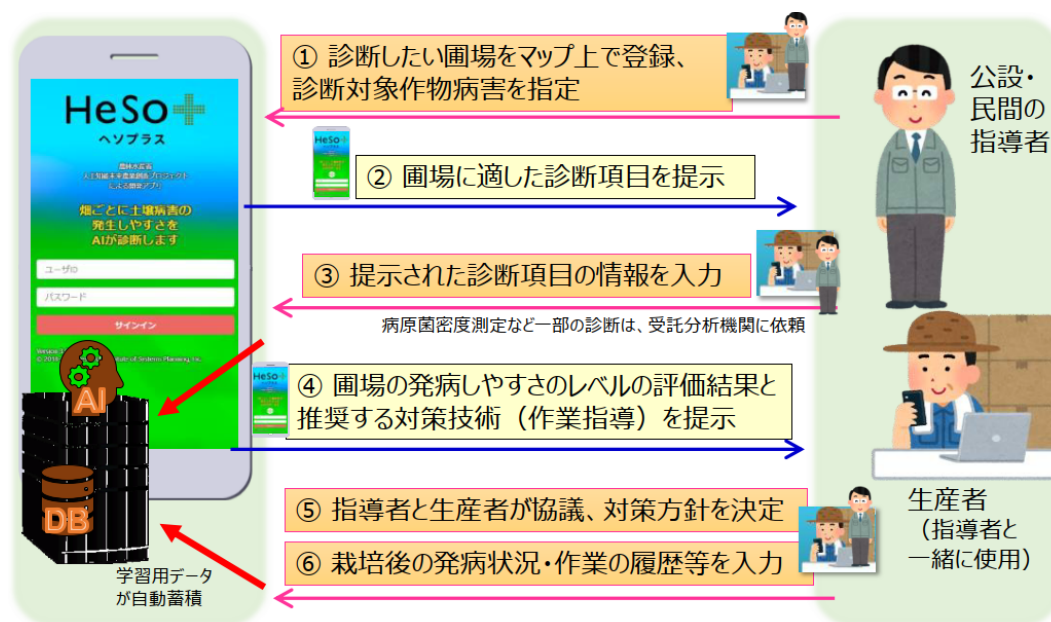


図3. HeSo+の利用フロー概略

HeSo+は、販売代理店のHeSoDiM普及協議会（<https://hesodim.or.jp/hesoplus/>）から販売が開始されており、多くの関係者による利用を通じて土壌病害の管理に役立ててもらいたいと考えている。具体的には、生産者と指導者が一緒になってHeSo+を使って対象圃場の発病ポテンシャルを診断し、診断結果を基に病害対策の方針や意思の決定に活用してもらいたい。これまでに、ブロッコリー圃場での根こぶ病の対策指導を行っている指導者がHeSo+を試用した結果では、HeSo+による診断結果に基づいた対策が成功したことに加え、本アプリを通じて生産者と密に病害管理方針の協議ができ、両者で円滑な合意形成が図れる効果があったとの評価が得られている。このことから、HeSo+は生産者と指導者との間の土壌病害管理に関するコミュニケーションツールとして活用されることが期待できる。

なお、HeSo+の利用にあたっては、予めAIの長所・短所を十分に理解した上で利用をしてもらうことが重要である。一般にAIは、データの複雑な組み合わせや微妙な兆候をとらえたり人が気づかない特徴を探し出すことが出来る利点があるとされているが、その一方で、AIの性能はデータの質・量に依存し、データの中からはしか学習できず、特殊な事例を見逃すことがあるなどの欠点もある。すなわち、AIは決して万能なものではなく、あくまでも道具の一つとして上手に使いこなすものであるという前提で利用することが重要である。HeSo+の利用では、発病ポテンシャルの診断結果にそのまま従うということではなく、診断結果を参考に、ユーザー自らが最終的な病害対策の判断・意思決定を主体的に行

うことが大切である。

5. ヘソディムの普及のための今後の課題

ヘソディムのより広域な普及や発展のためには、以下のような解決すべき技術的な課題が残されていると考える。すなわち、①これまで作成したマニュアルおよび HeSo+ では診断可能な対象病害に限られ、その他の重要な土壌病害に対応しきれていないこと、②一部病害に対する発病ポテンシャル診断において、労力やコストを要するものが含まれていること、が挙げられる。①では、各産地で問題となっている病害を対象に、仮説検証のアプローチで、まずはマニュアル案の作成からはじめ、それらの検証を通じて徐々に精度の高いヘソディムを完成させていく取り組みの強化が必要と考える。現在、筆者らのグループでは、南九州・沖縄地域のかんしょ産地で深刻な被害を与えているサツマイモ基腐病を対象に、現地での持続的なかんしょ生産に活用してもらうためのヘソディムの開発およびそのマニュアル化に取り組んでいるが、同様に各地で問題となっている病害に対するヘソディムの開発を進めていく必要がある。②では、例えば、現在の発病ポテンシャルの診断の中には、対象圃場や周辺圃場の発生状況が重要な診断項目として設定されている場合があるが、発生状況を複数の広い圃場で調査する労力は想像以上に大きい。また、病害によっては土壌抽出 DNA に基づく病原微生物の定性定量データも診断に必要となっているが、その取得のための労力やコストが相応にかかってしまうことも現状では否めない。こうした労力やコストの負担軽減には、各種 IoT 技術やデータマイニングの更なる活用などによってブレークスルーが図られる可能性がある。さらに、これらの技術的課題を克服する前提として、ヘソディムの考え方を理解し、さらには HeSo+ も使いこなせる人材を育成することも、新たなヘソディムの開発や普及を図る上できわめて重要である。こうした観点で、ヘソディムの普及や啓蒙に携わる機関では、定期的な勉強会などを開催して、人材を育成する取り組みも進められている。

6. 最後に

近年、「未病 (ME-BYO)」(健康と病気を「二分論」の概念で捉えるのではなく、心身の状態は健康と病気の間を連続的に変化するものとして捉え、この全ての変化の過程を表す概念 (厚生労働省, 2019)) という用語が話題に上がる機会が増えてきている。「未病」の概念を取り入れるメリットは、病気になる前からの予防的対策の意識を高めて、健康寿命を延ばすことと、医療費の抑制につながることにあるとされている。圃場における土壌病害の発生を考えてみた場合、健全圃場と発病圃場の二分論の考えよりも、健全圃場と発病圃場の間には連続的な変化の過程があるという概念のほうがあてはまりがよいと筆者は考える。すなわち、土壌病害管理に対しても「未病」の概念を取り入れ、予防的対策の意識を高めることで、圃場の持続的利用や防除コストの抑制につながることが期待できる。ヘソディムは、こうした「未病」の概念を取り入れた土壌病害の予防的対策に貢献できる管理法であるともいえよう。多くの生産現場で土壌病害の予防的管理が定着できるよう、今後もヘソディムの更なる進化研究、普及・啓蒙活動に取り組んでいきたい。

謝辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「土壌病害虫診断技術等の開発」、農林水産省農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「次世代型土壌病害診断・対策支援技術の開発」(25056C)、農林水産省委託プロジェクト研究「AIを活用した土壌病害診断技術の開発」(JP17935468)の支援により実施した。これらの研究プロジェクトは、全国の多くの公設試験研究機関や民間企業等の共同研究機関からの支援・協力をいただきながら実施したものである。共同研究機関の関係各位には、この場をお借りして改めて心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 群馬県農業技術センター (2016) キャベツバーティシリウム萎凋病のヘソディム。健康診断の発想に基づく土壌病害管理 ヘソディム研究成果発表会 p. 3. (講要)
- 一般財団法人日本土壌協会 (2020) 土壌診断のきほん 誠文堂新光社 pp.118-121.
- 鹿児島県農業開発総合センター (2019) キャベツ根こぶ病の発病レベルに応じた総合防除対策マニュアル。 https://www.pref.kagoshima.jp/ag11/pop-tech/nenndo/documents/81833_20200611095436-1.pdf
- 駒田旦 (1988) 土壌病害の発生生態と防除, タキイ種苗 (株) 広報出版部, 95 p.
- 駒田旦 (1998) 野菜の土壌病害, タキイ種苗 (株) 広報出版部, 127 p.
- 厚生労働省 (2019) 未病指標について。一般介護予防事業等の推進方策に関する検討会 第8回 参考資料 2, <https://www.mhlw.go.jp/content/12300000/000572154.pdf>
- 熊本県農業研究センター生産環境研究所 (2023) 発病リスク診断に基づく「キャベツ根こぶ病」防除マニュアル (冬春キャベツ) . <https://www.pref.kumamoto.jp/uploaded/attachment/224192.pdf>
- 美野光哉 (2014) 土壌分析事業の取り組みについて。土壌伝染病談話会レポート 27: 44-46.
- 桃井千巳 (2015a) 圃場診断に基づくチューリップ微斑モザイク病・条斑病の防除対策. 富山県農林水産総合技術センター園芸研究所 園研ニュース 9: 3.
- 桃井千巳 (2015b) 圃場診断に基づくチューリップ微斑モザイク病と条斑病の防除対策. EBC (Evidence-based Control) 研究会ワークショップ 2015 要旨集. pp.16-22./
- 西脇由恵 (2022) 畑の健康診断でブロッコリーを根こぶ病から守ろう。アグリポート 38. <https://agriport.jp/gardening/ap-4761/>
- 農業環境技術研究所 (2013) 健康診断に基づく土壌病害管理 ヘソディム 指導者向けマニュアル. <https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/hesodim/>
- 農業環境技術研究所 (2016) 土壌消毒剤を低減するためのヘソディム 指導者向けマニュアル. https://www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/techdoc/hesodim2/hesodim_manual.pdf
- 農研機構中央農業研究センター (2020) ダイズ黒根腐病のリスク診断・対策マニュアル. https://www.naro.go.jp/project/research_activities/soybeankuroneFull20200311_1.pdf.
- 農林水産省 (2021) みどりの食料システム戦略. <https://www.maff.go.jp/j/kanbo/kankyo/seisaku/midori/attach/pdf/index-10.pdf>
- 富山県農業研究所病理昆虫課 (2023) 水田転換畑におけるタマネギべと病の発病リスク表を用いた HeSoDiM マニュアル. 「みどりの食料システム戦略」技術カタログ (ver.3.0) . p.36.
- Tsushima, S. and S. Yoshida (2012) TUA-FFTC international seminar on emerging infectious diseases of food crops in Asia. Abstract, 204.

- ウェルシード, 国立研究開発法人農研機構近畿中国四国農業研究センター (2016) 農家支援技術としてのヘソディムの普及・実証. 健康診断の発想に基づく土壌病害管理 ヘソディム研究成果発表会 p. 20. (講要)
- 横田篤宣 (2023) 農薬の再評価について. 農薬新時代 4: 25-30.-
- Yoshida, S. and Tsushima, S. (2020) Development of a novel soil-borne disease management strategy, health checkup based soil-borne disease management (HeSoDiM). FFTC-AP Platform Policy Articles. <https://ap.ffc.org.tw/article/2529>
- 吉田重信 (2023) 圃場毎の土壌病害の発病ポテンシャルを診断する AI アプリ「HeSo+」の開発. 植物防疫 77: 31-35.

ペプチドを介した植物の病害抵抗メカニズム

松林 嘉克*・松井 彩・大久保 祐里・大西(小川) 真理

Matsubayashi, Y.*, Matsui, S., Ohkubo, Y., and Ogawa-Ohnishi, M.

Peptide-mediated mechanisms of plant disease resistance

Abstract

Topic 1

Deciding whether to grow or to divert energy to stress responses is a major physiological trade-off for plants surviving under fluctuating environments. We show that three leucine-rich repeat receptor kinases (LRR-RKs) act as direct ligand-perceiving receptors for PSY-family peptides, and mediate switching between two opposing pathways. In contrast to known LRR-RKs which activate signaling upon ligand binding, PSY receptors (PSYRs) activate the expression of various genes encoding stress response transcription factors upon depletion of the ligands. Loss of PSYRs results in defects in plant tolerance to both biotic and abiotic stresses. This ligand-deprivation-dependent activation system potentially enables plants to exert tuned regulation of stress responses in the tissues proximal to metabolically dysfunctional damaged sites where ligand production is impaired.

Topic 2

Plants initiate specific defense responses by recognizing conserved epitope peptides within the flagellin proteins derived from bacteria. Proteolytic cleavage of epitope peptides from flagellin by plant apoplastic proteases is thought to be crucial for perception of the epitope by the plant receptor. However, the identity of the plant proteases involved in this process remains unknown. We designed a substrate to specifically detect proteolytic activity at the C-terminus of the flg22 epitope in flagellin and identified two plant subtilases, SBT5.2 and SBT1.7, as specific proteases responsible for the C-terminal cleavage of flg22. In the apoplastic fluid of *Arabidopsis* mutant plants deficient in these two proteases, we observed a decrease in the C-terminal cleavage of the flg22 domain from flagellin, leading to a decrease in the efficiency of flg22 epitope liberation. Consequently, defensive reactive oxygen species (ROS) production was delayed in *sbt5.2 sbt1.7* double-mutant leaf disks compared to wild type following flagellin exposure.

Key words: Receptor kinase, Peptide, Subtilase, Plant immunity

名古屋大学大学院理学研究科 細胞間シグナル研究グループ Graduate School of Science, Nagoya University (*Corresponding author: matsu@bio.nagoya-u.ac.jp)

ウリ類炭疽病菌の酸化酵素ペアによる長鎖アルデヒドの生成と植物侵入

小玉紗代*・Bastien Bissaro**・Jean-Guy Berrin**・久保康之*

Kodama, S., Bissaro, B., Berrin, J.G., Kubo, Y.

Production of long-chain aldehydes by the tandem oxidase pair for plant infection in *Colletotrichum orbiculare*.

Abstract

Copper-Radical Oxidases (CROs), from the Auxiliary Activity family of the Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) classification, are a well-studied class of enzymes with diverse substrate specificities. While some of these enzymes are of great interest for biotechnological applications, the biological function of most fungal CROs remains unknown. Based on the observation that genes encoding secreted alcohol oxidase (AlcOx) orthologs are almost exclusively found in phytopathogenic ascomycete fungi, we investigated the function of AlcOx of the cucumber anthracnose fungus *C. orbiculare*. We found that AlcOx was activated by a peroxidase (Perox) encoded by an adjacent gene of AlcOx. Gene deletion analysis suggested a role of Perox-AlcOx in the cucumber infection by *C. orbiculare*. Furthermore, fluorescent protein-tagged AlcOx and Perox accumulated at the penetration pore during appressorium infection. We detected activity of the Perox-AlcOx pair on aliphatic alcohols including octadecanol and a crude preparation of waxes extracted from cucumber cotyledons. Product analysis showed that octadecanol was oxidized to the corresponding aldehyde, n-octadecanal. The addition of n-octadecanal partially restored appressorium penetration ability and lesion formation of Perox-AlcOx gene deletion mutant, suggesting that the role of the Perox-AlcOx pair is to generate long-chain aldehydes to prime the fungus for efficient plant infection. Transcriptome analyses of *C. orbiculare* wild-type and Perox-AlcOx gene deletion mutant revealed that the Perox-AlcOx pair contributes to the regulation of a subset of plant-inducible genes predicted to encode CAZymes directed toward the plant cell wall and the fungal cell wall, and small secreted proteins. Therefore, the Perox-AlcOx pair provides the localized production of long chain aldehydes for transcriptional regulation of genes that enable host infection. In this article, we review our current understanding of the molecular mechanism that cuticle oxidization by a tandem metalloenzymes at appressorial stage driving plant penetration.

Key words: *Colletotrichum orbiculare*, Appressorium, Copper-Radical Oxidases (CROs), Long-chain aldehydes, Octadecanal

* 摂南大学農学部 Faculty of Agriculture, Setsunan University (*Corresponding author: yasuyuki.kubo@setsunan.ac.jp)

** INRAE, Aix Marseille Université

1. はじめに

植物病原性の糸状菌であるウリ類炭疽病菌は宿主となる植物表面に孢子が接着すると劇的な感染器官（付着器）の形態分化を行い、様々なタンパク質分泌を介した宿主との相互作用を経て感染を成立させる（Gan et al., 2013）．このような形態分化を伴う病原菌の侵入過程には植物表層成分に対する応答が重要であることが明らかになってきた．糸状菌類が豊富に持つ糖質関連酵素群（Carbohydrate-Active enZyme; CAZymes）のうち、銅ラジカルオキシダーゼ（Copper radical oxidases; CROs）の一つである機能未知の分泌性アルコール酸化酵素 AlcOx が特定の植物病原性子囊菌にのみ存在し、特に植物の表皮に多く含まれる長鎖脂肪族アルコールをアルデヒドに酸化できるという観察に基づいて、AlcOx の病原性への寄与を検証するため、バイオインフォマティクスおよび生化学的な手法を用いた構造機能解析と細胞生物学的・植物病理学的な解析を多面的に組み合わせた研究が行われた．本稿では、ウリ類炭疽病菌が2つの分泌性酸化酵素を介して宿主植物に感染する分子機序について紹介する．

2. ウリ類炭疽病菌が分泌するタンデム型酸化酵素ペア Perox-AlcOx の同定

植物病原糸状菌には糖質関連酵素（Carbohydrate-Active enZyme; CAZymes）をコードする遺伝子が豊富に存在し、アミノ酸配列の類似性に基づいて分類されてきた（Cantarel et al., 2009）．細胞壁分解酵素として知られるクラスは植物細胞壁分解による侵入の促進や菌細胞壁の構成、栄養取得に寄与することが知られている（Zhao et al., 2013）．CAZymes の中でも Auxiliary Activity; AA（補助活性酵素）ファミリーに属する銅ラジカルオキシダーゼ（Copper radical oxidases; CROs）は多様な基質特異性を持つ酵素であり、ガラクトース 6-オキシダーゼ、グリオキサールオキシダーゼ、そして第一級アルコールオキシダーゼが含まれる（Cooper et al., 1959; Kersten and Kirk, 1987; Yin et al., 2015）．いくつかの CRO はバイオポリマーの酸化による新しいバイオマテリアルの生産や、脂肪アルデヒドの酸化による香料・フレグランス産業への応用といった生体触媒としての工業利用のため、酵素学および構造的に研究されてきた（Ribeaucourt et al., 2022）．一方で、その生物学的な機能はほとんど理解されていない．

本研究も当初はフレグランス産業とのコラボレーションにより、香水に使用される柑橘系の香りの分子を自然に生成できる菌類の酵素を特定することを目的としていた．この応用研究の過程で、二種類の酸化酵素（アルコール酸化酵素: AlcOx とペルオキシダーゼ: Perox）の遺伝子が *Colletotrichum* 属と *Magnaporthe* 属を含む特定の植物病原性子囊菌類のゲノムにのみ Head-to-Head の配置で隣接して（タンデムに）存在することが見出された（図 1）（Yin et al., 2015）．これらの遺伝子間には約 1 kb であることから、プロモーターを共有している可能性が考えられた．このことは対合を維持するための選択圧が存在し、これらの病原菌において何らかの重要な役割を持つ可能性を示している．興味深いことに、以前 *in vitro* で行われた研究において AlcOx に市販のペルオキシダーゼ（ホースラディッシュペルオキシダーゼ; HRP）を添加すると、メカニズムは不明であるものの AlcOx 活性が最大まで増加することが報告されていた（Parikka and Tenkanen, 2009; Forget et al., 2020）．このような発見をきっかけに、バイオインフォマティクスおよび生化学的な手法を用いた構造機能解析と、細胞生物学的・植物病理学的な解析を多面的に組み合わせた共同研究が行われた．通常、特定の酵素について生物学的なメカニズムを研究し、その知見をバイオ

テクノロジーへ活用することが多く、本研究は非常に珍しいケースと言える。

3. 植物侵入におけるタンデム型酸化酵素ペアの機能

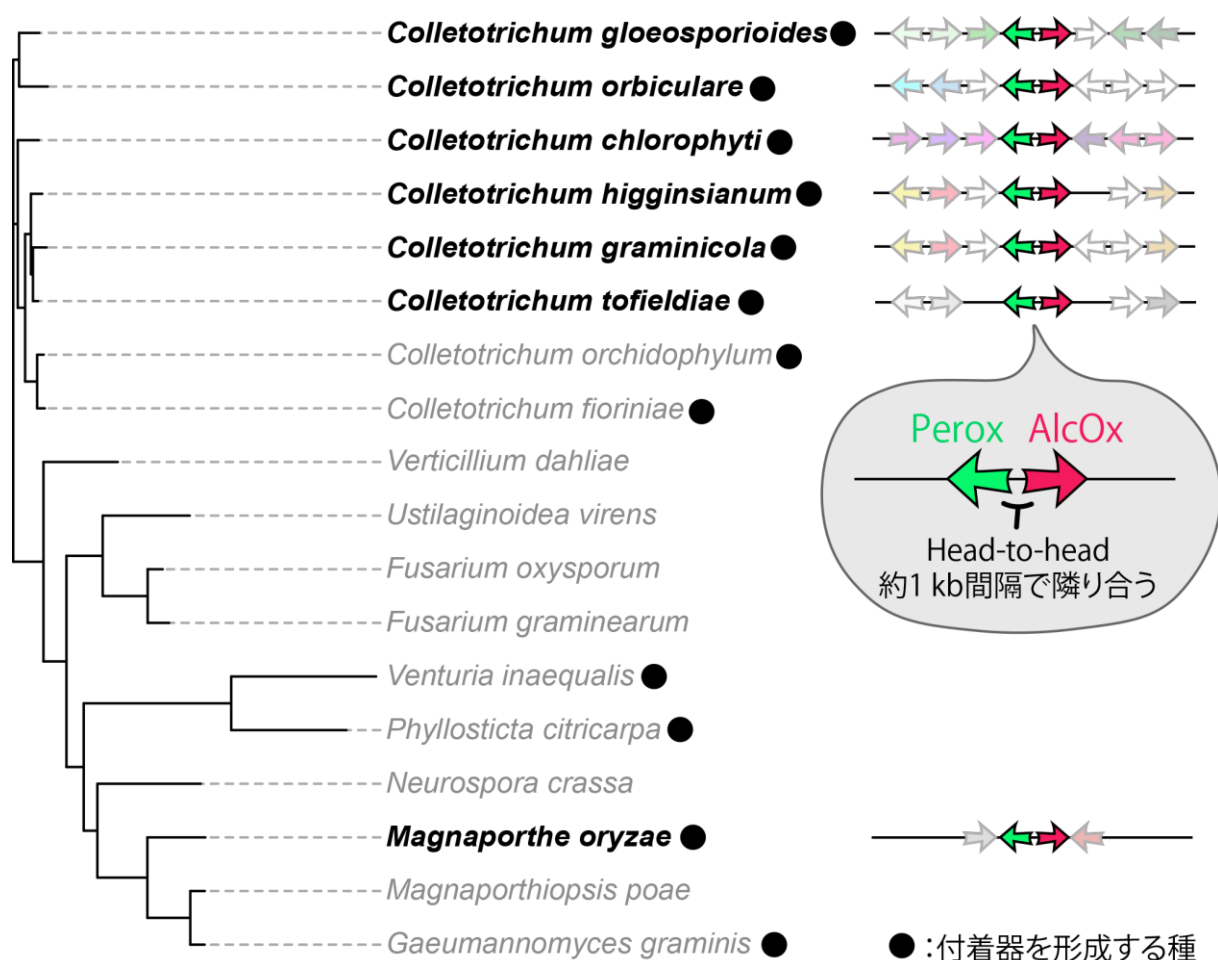


図1. 植物病原性の糸状子嚢菌間における酸化酵素ペアの系統発生.

黒字は酸化酵素ペア遺伝子が Head-to-head の配置で保存されている種を示し、灰色の種には遺伝子ペアが存在しない。

アルコール酸化酵素 (AlcOx) とその活性化に必要なペルオキシダーゼ (Perox) が隣接してゲノムに存在する植物病原菌類の多くは植物に感染する際に、植物表層環境に応答して付着器と呼ばれる宿主植物への侵入に特化した感染器官の形態分化を行い、宿主植物との境界面における植物細胞壁分解酵素の分泌やエフェクターと総称される分泌タンパク質群による宿主免疫抑制などの植物との複雑な相互作用を経て感染を成立させる (McDowell, 2013; Ryder, 2015) . それでは、これらの植物病原菌の感染過程において、どの時期に酸化酵素ペアは働くのだろうか. 付着器を介した侵入を行う炭疽病菌類およびいもち病菌の感染時におけるトランスクリプトーム解析の以前の結果から、酸化酵素ペア遺伝子が付着器侵入直前の時期に特異的に共発現することが見出された (O'Connell et al., 2012; Gan et al., 2013; Dong et al., 2015; Shimizu et al., 2019) . さらに、酸化酵素ペアにはそれぞれ菌体外への分泌を示唆する分泌シグナル配列が含まれており、蛍光タンパク質で標識したウリ類炭疽病菌の酸化酵素ペアは共に付着器侵入孔に特異的に蓄積していた. 付着器を除去したと

ころ接着部位には蛍光シグナルが残っており、これらの酵素がウリ類炭疽病菌の侵入部位から植物側へと分泌されていることがわかった (Bissaro et al., 2022) . また、遺伝子破壊により酸化酵素ペアを欠損させた結果、菌の形態形成に変化は認められなかった一方で、AlcOx または Perox のいずれかが無ければウリ類炭疽病菌は植物にほとんど付着器侵入できなくなり、酸化酵素ペアは炭疽病菌の病原性に必要であることが示唆された (Bissaro et al., 2022) . 以上の結果から、ウリ類炭疽病菌は付着器から植物に貫穿糸を突き刺して侵入しようとする時に酸化酵素ペアを植物表面へと分泌することで、付着器侵入を成功させていることが明らかになった。

4. タンデム型酸化酵素ペアの基質と生成物の同定

酸化酵素ペアの植物侵入における役割を調査するためにまず、ウリ類炭疽病菌の AlcOx および Perox をそれぞれ *Pichia pastoris* 異種発現系で生成し、基質特異性と酵素間の相互作用を調査した。その結果、これまでに研究された *C. graminicola* および *C. gloeosporioides* 由来の AlcOx オルソログ (Yin et al., 2015) と同様にウリ類炭疽病菌の AlcOx はオクタデカノール、1,16-ヘキサデカンジオールなどの葉ワックス抽出物に含まれる芳香族および長鎖脂肪族第一級アルコールの両方を酸化してそれぞれに対応する長鎖アルデヒドを生成することがわかった (図2) . つまり、多くの植物種の表層を覆っているワックス・クチクラ層に存在する脂肪質の第一級アルコールが、AlcOx の天然の基質であると考えられた。さらに AlcOx は Perox と複合体を形成し、Perox は用量依存的に市販の植物 HRP よりも顕著

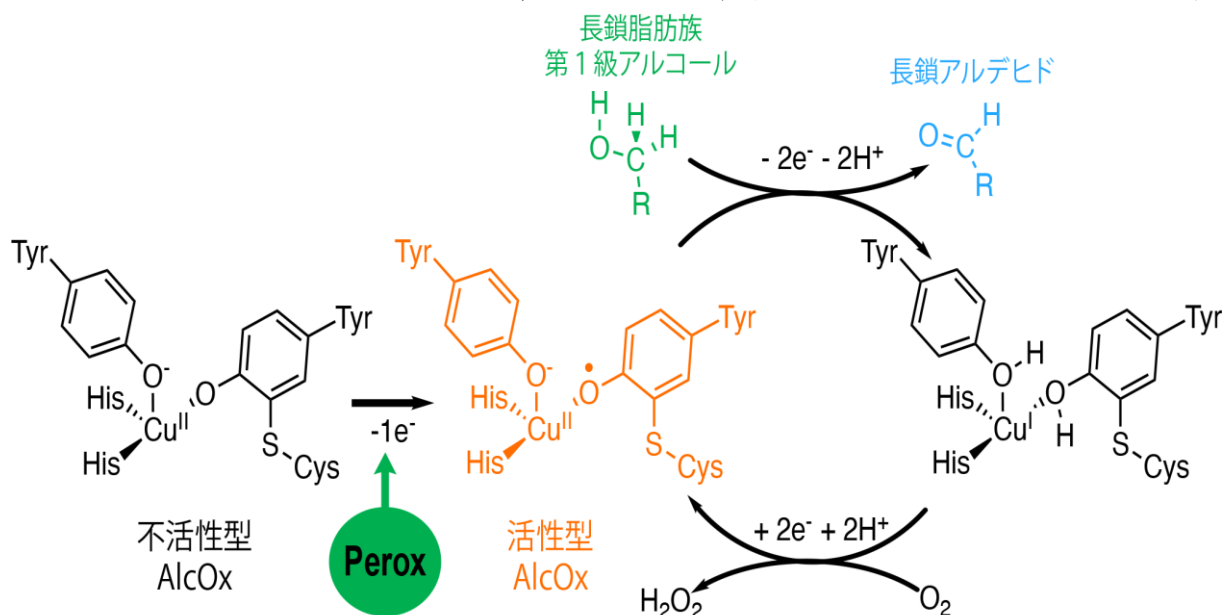


図2. 銅ラジカルオキシダーゼ AlcOx の反応機構.

不活性型 AlcOx は Perox により Cu(II)ラジカル活性型を形成する。活性型 AlcOx は長鎖脂肪族第1級アルコールを対応する長鎖アルデヒドに酸化し、続いて O₂ から H₂O₂ への2電子還元により活性型の再生が生じる。

に AlcOx を活性化させた。Perox の存在により AlcOx の酸化還元活性型が形成され、AlcOx の活性部位に存在するチロシンラジカルと Cu(II) 原子により、アルコールがアルデヒドに2電子酸化されることがわかった (図2) (Bissaro et al., 2022) . このことから、Perox は AlcOx 活性を厳密に制御できる酸化還元スイッチとして機能していると考えられた。また、

ウリ類炭疽病菌と同様に付着器侵入を行うイネいもち病菌から異種発現系で取得した酸化酵素ペアも類似した生化学的特徴を持っており、酸化酵素ペアの性質は付着器侵入を行う病原菌類が共通して保持している可能性が示された (Bissaro et al., 2022) .

酸化酵素ペアの基質と生成物が特定できたことで、これらの酵素の侵入時における役割は単に菌の細胞壁の構成などではなく、宿主植物との相互作用にある可能性が高まった。興味深いことに、酸化酵素ペアの遺伝子破壊株はほとんど付着器侵入できなくなるが、酸化酵素ペアの生成物の一つである脂肪族長鎖アルデヒド（オクタデカナール）を添加することによって破壊株の植物への付着器侵入および病原性が部分的に復帰した (Bissaro et al., 2022) . このことは、酸化酵素ペアの役割はオクタデカナールを含む長鎖アルデヒドを生成し、その局所濃度を高め効率的に植物に感染できるように準備することである可能性を示している。

5. 酸化酵素ペアを介した付着器侵入時の病原性関連遺伝子群の発現調節

我々はこれまでに、ウリ類炭疽病菌が感染の最初期にオクタデカナールを含む植物表層成分をシグナル分子として感知することによって、NDR (nuclear Dbf2-related) キナーゼ Cbk1 と足場タンパク Pag1 からなる細胞内シグナル伝達経路 MOR (morphogenesis-related NDR kinase pathway) を活性化させ、その下流の転写因子 Mtf4 を介して付着器形成を誘導することを報告している (図3) (Kodama et al., 2017 and 2019) . 興味深いことに今回、酸化酵素ペアの生成物の一つとしてオクタデカナールが同定されたことから、付着器侵入直前のタイミングで酸化酵素ペアによって生成されたオクタデカナールを含む長鎖アルデヒドがシグナル分子としてウリ類炭疽病菌に認識され、細胞内のシグナル伝達および遺伝子発現制御を介して付着器侵入が促進されている可能性が考えられた。そこで、ウリ類炭疽病菌の野生株と酸化酵素ペアの二重破壊株を用いたトランスクリプトーム比較解析を行った。その結果、酸化酵素ペアはウリ類炭疽病菌の感染時に CAZymes, Small Secreted Proteins (SSPs) および膜輸送体をコードする遺伝子群の発現制御に関与していることがわかった。SSPs と CAZymes は宿主植物との相互作用において重要なエフェクターとして知られている。系統解析によりこれらの CAZymes には植物細胞壁を対象とするペクチン分解酵素、セルロース分解酵素に属するセルロースオリゴ糖脱水素酵素および溶解性多糖モノオキシゲナーゼ (Lytic polysaccharide monooxygenases; LPMOs) , もしくは真菌細胞壁を対象とするキチン結合 LysM モチーフを持つ推定エフェクターが含まれることが示された (Bissaro et al., 2022) . *Phytophthora infestans* では、LPMO とオリゴ糖酸化酵素が植物オリゴ糖を酸化的に分解し宿主免疫応答の誘導を抑制することが示唆されている (Haddad et al., 2021; Sabbadin et al., 2021; Vandhana et al., 2022) . また、ウリ類炭疽病菌の LPMO は付着器侵入に寄与することが示唆されている (Tamburrini et al., 2024) . *C. higginsianum* では、LysM タンパク質はキチン誘発免疫を抑制するエフェクターとして、また付着器機能に必要なタンパク質として報告されている (Takahara et al., 2016) . 以上の結果から、酸化酵素ペアは単にそれ自体が植物表層成分を分解することによって侵入を促進するのではなく、酸化酵素ペアにより局所的に生成された長鎖アルデヒドがシグナル分子となってウリ類炭疽病菌の病原性関連遺伝子群の発現が誘導され、付着器侵入を促進し、宿主免疫応答を回避する遺伝子の発現を伴う次の感染段階への移行を成功させていると考えられた (図3) .

炭疽病菌やイネいもち病菌を含む付着器侵入を行う植物病原糸状菌において、付着器の形成には植物表面への接着とその認識が重要であり、植物表層成分と付着器誘導の関連性については報告されている (Tucker and Talbot, 2001; Kumamoto, 2008) . 本研究の結果から、付着器誘導のためだけでなくその後の付着器侵入段階においても植物表層成分に対する応答が重要である可能性が新たに示されたことから、ウリ類炭疽病菌では感染時の菌類と植物のコミュニケーションには 2 つの段階があると考察している (図 3) (Kodama et al., 2023) . まず、第 1 段階として MOR カスケードとその下流転写因子 Mtf4 が植物表層成分をシグナル分子として付着器の形態形成へと変換する。その後さらに、第 2 段階として付着器を介した侵入段階に進むために、酸化酵素ペアを介して植物表層成分を感知・応答することで自己の遺伝子発現を調節し感染を成功させていると考えられる。

6. 最後に

本稿では、炭疽病菌が分泌する二種類の酸化酵素がペアになって植物表層成分から長鎖アルデヒドを生成し、それが付着器侵入時の病原性関連遺伝子の発現調節を引き起こすという新たな感染メカニズムについて紹介した。酸化酵素ペアは同様の感染様式を持っているほとんどの *Colletotrichum* 属菌および *Magnaporthe* 属菌に特異的に存在することから、機能的に同等な酸化酵素機構が他の付着器形成を行う菌類でも機能している可能性が考えられる。今後、他の病原菌における酸化酵素ペアの機能保存性の検証と併せて、酸化酵素ペアを介した長鎖アルデヒド生成がどのようにして本菌の遺伝子発現制御および病原性に関与するのかさらに解析を進めていきたい。

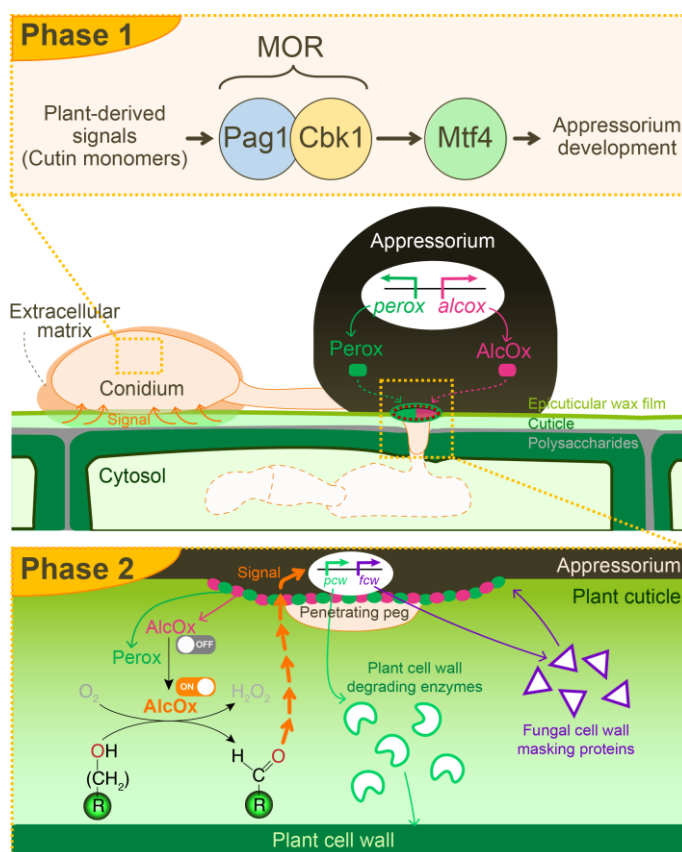


図 3. ウリ類炭疽病菌の植物表面シグナル認識と付着器侵入のモデル図。

Phase 1: 分生子細胞外マトリックスのエステラーゼ活性によりクチクラ層からクチンモノマーが生成され、足場タンパク Pag1, NDR キナーゼ Cbk1 からなる MOR 経路と下流転写因子 Mtf4 を介して付着器形成が誘導される。Phase 2: 貫穿糸形成直前にアルコール酸化酵素 (AlcOx) とペルオキシダーゼ (Perox) を共発現し侵入部位に集積させる。Perox が AlcOx を活性化させ、活性化 AlcOx はワックス・クチクラ層成分から長鎖アルデヒドを生成する。生成された長鎖アルデヒドがシグナル分子となって炭疽病菌の病原性関連遺伝子の発現を誘導する。これには植物細胞壁分解酵素や菌の細胞壁を被隠するタンパク質が含まれる。

謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費の支援を受けて行われました。

引用文献

- Bissaro B, Kodama S, Nishiuchi T, Díaz-Rovira AM, Hage H, Ribeaucourt D, Haon M, Grisel S, Simaan AJ, Beisson F, Forget SM, Brumer H, Rosso MN, Guallar V, O'Connell R, Lafond M, Kubo Y, Berrin JG. (2022) Tandem metalloenzymes gate plant cell entry by pathogenic fungi. *Sci Adv.* Dec 21;8(51):eade9982.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* Jan;37 (Database issue):D233-8.
- Cooper JA, Smith W, Bacila M, Medina H. (1959) Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr. *J Biol Chem.* Mar;234(3):445-8.
- Dong Y, Li Y, Zhao M, Jing M, Liu X, Liu M, Guo X, Zhang X, Chen Y, Liu Y, Liu Y, Ye W, Zhang H, Wang Y, Zheng X, Wang P, Zhang Z. (2015) Global genome and transcriptome analyses of *Magnaporthe oryzae* epidemic isolate 98-06 uncover novel effectors and pathogenicity-related genes, revealing gene gain and lose dynamics in genome evolution. *PLoS Pathog.* Apr 2;11(4):e1004801.
- Forget SM, Xia FR, Hein JE, Brumer H. (2020) Determination of biocatalytic parameters of a copper radical oxidase using real-time reaction progress monitoring. *Org Biomol Chem.* Mar 18;18(11):2076-2084.
- Gan P, Ikeda K, Irieda H, Narusaka M, O'Connell RJ, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, Shirasu K. (2013) Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytol.* Mar;197(4):1236-1249.
- Haddad Momeni M, Fredslund F, Bissaro B, Raji O, Vuong TV, Meier S, Nielsen TS, Lombard V, Guigliarelli B, Biaso F, Haon M, Grisel S, Henrissat B, Welner DH, Master ER, Berrin JG, Abou Hachem M. (2021) Discovery of fungal oligosaccharide-oxidising flavo-enzymes with previously unknown substrates, redox-activity profiles and interplay with LPMOs. *Nat Commun.* Apr 9;12(1):2132.
- Kersten PJ, Kirk TK. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol.* May;169(5):2195-201.
- Kodama S, Ishizuka J, Miyashita I, Ishii T, Nishiuchi T, Miyoshi H, Kubo Y. (2017) The morphogenesis-related NDR kinase pathway of *Colletotrichum orbiculare* is required for translating plant surface signals into infection-related morphogenesis and pathogenesis. *PLoS Pathog.* Feb 1;13(2):e1006189.
- Kodama S, Nishiuchi T, Kubo Y. (2019) *Colletotrichum orbiculare* MTF4 is a key transcription factor downstream of MOR essential for plant signal-dependent appressorium development and pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* Mar;32(3):313-324.
- Kodama S., Bissaro B., Berrin JG, Kubo Y. (2023) Plant surface signal sensing and infection-related morphogenesis of *Colletotrichum orbiculare*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 124, 101979.
- Kumamoto CA. (2008) Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. *Nat Rev Microbiol.* Sep;6(9):667-73.
- McDowell JM. (2013) Genomic and transcriptomic insights into lifestyle transitions of a hemi-biotrophic fungal pathogen. *New Phytol.* Mar;197(4):1032-1034.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N, Altmüller J, Alvarado-Balderrama L, Bauser CA, Becker C, Birren BW, Chen Z, Choi J, Crouch JA, Duveck JP, Farman MA, Gan P, Heiman D, Henrissat B, Howard RJ, Kabbage M, Koch C, Kracher B, Kubo Y, Law AD, Lebrun MH, Lee YH, Miyara I, Moore N, Neumann U, Nordström K, Panaccione DG, Panstruga R, Place M, Proctor RH, Prusky D, Rech G, Reinhardt R, Rollins JA,

- Rounsley S, Schardl CL, Schwartz DC, Shenoy N, Shirasu K, Sikhakolli UR, Stüber K, Sukno SA, Sweigard JA, Takano Y, Takahara H, Trail F, van der Does HC, Voll LM, Will I, Young S, Zeng Q, Zhang J, Zhou S, Dickman MB, Schulze-Lefert P, Ver Loren van Themaat E, Ma LJ, Vaillancourt LJ. (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Genet.* Sep;44(9):1060-5.
- Parikka K, Tenkanen M. (2009) Oxidation of methyl alpha-D-galactopyranoside by galactose oxidase: products formed and optimization of reaction conditions for production of aldehyde. *Carbohydr Res.* Jan 5;344(1):14-20.
- Ribeaucourt D, Bissaro B, Lambert F, Lafond M, Berrin JG. Biocatalytic oxidation of fatty alcohols into aldehydes for the flavors and fragrances industry. (2022) *Biotechnol Adv.* May-Jun;56:107787.
- Ryder LS, Talbot NJ. (2015) Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol.* Aug;26:8-13.
- Sabbadin F, Urresti S, Henrissat B, Avrova AO, Welsh LRJ, Lindley PJ, Csukai M, Squires JN, Walton PH, Davies GJ, Bruce NC, Whisson SC, McQueen-Mason SJ. (2021) Secreted pectin monooxygenases drive plant infection by pathogenic oomycetes. *Science.* Aug 13;373(6556):774-779.
- Shimizu M, Nakano Y, Hirabuchi A, Yoshino K, Kobayashi M, Yamamoto K, Terauchi R, Saitoh H. (2019) RNA-Seq of in planta-expressed *Magnaporthe oryzae* genes identifies *MoSVP* as a highly expressed gene required for pathogenicity at the initial stage of infection. *Mol Plant Pathol.* Dec;20(12):1682-1695.
- Takahara H, Hacquard S, Kombrink A, Hughes HB, Halder V, Robin GP, Hiruma K, Neumann U, Shinya T, Kombrink E, Shibuya N, Thomma BP, O'Connell RJ. (2016) *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity. *New Phytol.* Sep;211(4):1323-37.
- Tamburrini KC, Kodama S, Grisel S, Haon M, Nishiuchi T, Bissaro B, Kubo Y, Longhi S, Berrin JG. (2024) The disordered C-terminal tail of fungal LPMOs from phytopathogens mediates protein dimerization and impacts plant penetration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 26;121(13):e2319998121.
- Tucker SL, Talbot NJ. (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 39:385-417.
- Vandhana TM, Reyre JL, Sushmaa D, Berrin JG, Bissaro B, Madhuprakash J. (2022) On the expansion of biological functions of lytic polysaccharide monooxygenases. *New Phytol.* Mar;233(6):2380-2396.
- Yin DT, Urresti S, Lafond M, Johnston EM, Derikvand F, Ciano L, Berrin JG, Henrissat B, Walton PH, Davies GJ, Brumer H. (2015) Structure-function characterization reveals new catalytic diversity in the galactose oxidase and glyoxal oxidase family. *Nat Commun.* Dec 18;6:10197.
- Zhao Z, Liu H, Wang C, Xu JR. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. (2013) *BMC Genomics.* Apr 23;14:274.

宿主植物のゲノム上に展開する異種炭疽病菌に対する 抵抗性遺伝子ネットワークの解明に向けて

鳴坂 真理*・鳴坂 義弘

Narusaka, M*. and Narusaka, Y.

Molecular mechanisms of *Resistance*-gene network against anthracnose fungi in the host genome

Abstract

Colletotrichum species cause anthracnose diseases in various important crops and ornamental plants, appearing as dark spots or sunken lesions. A collection of 100 *Arabidopsis thaliana* ecotypes exhibited diverse responses to infection by the crucifer pathogen *Colletotrichum higginsianum*. When challenged with *C. higginsianum*, the Col-0 ecotype developed necrotic lesions within 2-3 days, whereas Eil-0 and Ws-2 showed resistance with only minor symptoms. Using map-based cloning and natural variation analysis, we identified the dominant resistance loci *RPS4* and *RRS1*. Both genes are also essential for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato expressing *avrRps4* and *Ralstonia solanacearum*, forming a dual resistance system against multiple pathogens. In addition to *RPS4* and *RRS1*, we identified another resistance locus, *RCH1*, against anthracnose disease caused by *C. higginsianum*. We also discovered a novel resistance locus, *RCI1*, against anthracnose disease caused by *Colletotrichum incanum*. Therefore, resistance to anthracnose in *A. thaliana* is mediated by a repertoire of *R* genes. Although NB-LRR-type *R* genes, which are critical for disease resistance, have been challenging to transfer between taxonomically distinct families, we demonstrated that *Arabidopsis* genes *RPS4* and *RRS1* function effectively in other Brassicaceae (*Brassica rapa*, *Brassica napus*) and Solanaceae (*Nicotiana benthamiana*, tomato). Transgenic Solanaceae plants expressing *RPS4* and *RRS1* showed specific immunity responses without autoimmune issues, indicating well-regulated NB-LRR proteins. Additionally, these genes confer resistance to *Colletotrichum orbiculare* in transgenic cucumber, a Cucurbitaceae. The functional interfamily transfer of *R* genes can be a powerful strategy for providing resistance to a broad range of pathogens.

Key words: *Colletotrichum*, *R* gene, Plant immunity, *RPS4*, *RRS1*

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry, and Fisheries, Research Institute for Biological Sciences (*Corresponding author: ma_narusaka@bio-ribs.com)

1. はじめに

アブラナ科植物のシロイヌナズナは世界で最も研究が進んだモデル植物であり、多種多様なリソースと豊富な技術、情報が蓄積されている。このためシロイヌナズナを活用すれば、進化生物相関学や、有用遺伝子の探索と機能解明を迅速に進めることができる。そしてその成果をゲノム編集技術などを介して産業植物に適用することにより、革新的な農業技術の開発につなげることが可能である。そこで私たちは、作物に重篤な病害を引き起こす炭疽病菌に対する防御機構を解明するため、シロイヌナズナを対象とした分子レベルの研究を進めてきた。炭疽病は、糸状菌（カビ）の一種である *Colletotrichum* 属菌によって引き起こされる病害で、600 種以上の穀物、野菜、果樹、花卉などで確認されている (O'Connell *et al.*, 2012)。炭疽病に感染した植物は、葉、茎、枝、果実などに円形または紡錘形の暗褐色の病斑を生じ、激しい場合は枯死に至る。一方で、シロイヌナズナの生態型は世界中に 200 種類以上も存在する。これら地域個体群は、それが生育する生物学的および非生物学的ストレスを受けて適応的に徐々に分化することで、遺伝的な構造が他の地域のものとは異なっている。特に、生物学的ストレスにおいて、植物は、病原体の攻撃を認識して病害抵抗性を発動するために *R* (*Resistance*) 遺伝子を獲得し、これに対抗してきた。このような宿主植物と病原体の相互作用による進化は従来、軍拡競争型適応進化と考えられていたが、近年、これらは植物-病原体間の適応共進化と捉えられるようになり、両ゲノム間における複雑かつ多様な相互作用システムの進化・維持機構が働いている。私たちは、世界各地に分布するモデル植物シロイヌナズナの異なる生態型を用いて、病害抵抗性に関与する *R* 遺伝子の構造と機能が、病原糸状菌および病原細菌に対する抵抗性とどのように対応しているかを比較し、さらに、植物の *R* 遺伝子と病原体の非病原力 (*Avr*) 遺伝子間の相互作用を明らかにすることで植物の病害抵抗性の獲得における適応共進化のプロセスの解明をめざしてきた。

本報告では、作物に重篤な病害を引き起こす炭疽病菌に対する植物の防御機構を解明するため、シロイヌナズナを用いて、宿主植物のゲノム上に異種炭疽病菌に対する複数の *R* 遺伝子座が存在することの意義や、宿主植物-病原体間の適応共進化について、私たちがこれまでに行ってきた研究の成果を紹介する。

2. R タンパク質による病原体の認識

近年のゲノム解析の結果、病原細菌は数十種、病原糸状菌は千種以上の分泌タンパク質遺伝子をゲノム上に有していると推定され、これらの膨大な分泌タンパク質（エフェクターと呼ばれる）を駆使することで、植物細胞および組織の破壊を行い、植物が本来発揮すべき抵抗性を妨害してその感染を成立させている。これに対して、植物は *R* (*Resistance*) タンパク質により病原体が放出する分泌タンパク質（特に *Avr* エフェクターという）を認識し病原体に対する抵抗性を発揮している（エフェクター誘導免疫, effector-triggered immunity: ETI）。

エフェクターを認識する *R* タンパク質の多くは、核酸結合ドメイン (nucleotide binding site: NB) とロイシンリッチリピートドメイン (leucine-rich repeat domain: LRR) を有しており NB-LRR 型受容体 (NB-LRR receptor: NLR) と呼ばれている。NLR は、N 末端領域のドメインの構造によりコイルドコイル (coiled-coil: CC) ドメイン型と TIR (Toll/interleukin-1 receptor) ドメイン型に大別される。

これらの *R* タンパク質はエフェクターを直接または間接的に認識し、過敏感細胞死などを

伴う強い抵抗反応を誘導すると考えられている. ETI における R タンパク質のエフェクターの認識機構は, R タンパク質がエフェクターと直接結合する場合 (レセプター – リガンドモデル), R タンパク質は特定の宿主因子をモニターしており, エフェクターの作用による本因子の状態の変化を認識する場合 (ガードモデル) および, デコイ (おとり) におびき寄せられたエフェクターを R タンパク質が認識する場合 (デコイモデル) が知られている (図 1).

ETI は, Flor (1942) が唱えた遺伝子対遺伝子仮説により, 植物の R 遺伝子 (病原体を認識する植物側の受容体) と, 対応する病原体の非病原力遺伝子 (Avr エフェクター) の 1 対 1 の組み合わせによって決定されたと考えられてきた. しかし, 1001 ゲノムプロジェクト (1001 Genomes Consortium, 2016) で得られた情報をもとに収集された NLR 遺伝子 (R 遺伝子) は, モデル実験植物のシロイヌナズナのゲノム上に 167~251 個 (Weyer *et al.*, 2019), イネにおいても約 400~600 個しか存在しない. このため, わずかな R 遺伝子で, 数十万の病原微生物にどのように対応しているのかを解明することが植物病理学の大きな課題であった. これに対して, 上述のガ

ード/デコイモデルでは, R タンパク質は病原菌が放出するエフェクターを直接認識するのではなく, その攻撃のターゲット分子をモニターすることにより, エフェクターを間接的に検出するというものである. この説に従うと, 限られた数の R タンパク質によって, 多くの病原菌を認識することが可能となる.

3. R タンパク質ペア RPS4/RRS1 の発見

前述の通り, *Colletotrichum* 属菌による病害は 600 種以上が知られており, 特にイチゴ炭疽病 (日本国内の被害額 35~160 億円/年) (Sato and Moriwaki, 2009), トウモロコシ炭疽病 (トウモロコシ全生産量の約 6% の減収要因, 米国の被害額 1 billion dollars/年), ウリ類炭疽病の防除は世界的に重要な課題である. 私たちはアブラナ科植物に感染する病原糸状菌であるアブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*, 以下アブラナ炭疽病菌と略す) に着目し研究を開始した.

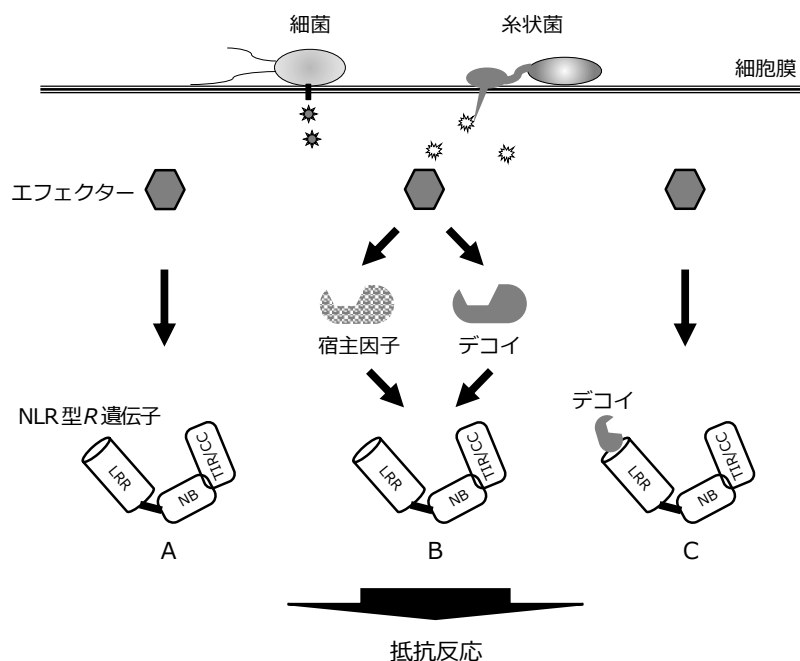


図 1. R タンパク質によるエフェクターの認識モデル
レセプター – リガンドモデル(A), R タンパク質が特定の宿主因子をモニターしており, エフェクターの作用による本因子の状態の変化を認識する場合 (ガードモデル) (B 左), デコイ (おとり) におびき寄せられたエフェクターを R タンパク質が認識する場合 (デコイモデル) (B 右), デコイを組み入れた R タンパク質がエフェクターを認識する場合 (C).

病原糸状菌 *Colletotrichum* 属菌は進化の過程で多様な種分化を遂げている。しかしながら、その極めて広範な宿主範囲と菌種ごとに異なる宿主特異性を生むメカニズムは明らかにされていない。初めに、私たちは、アブラナ炭疽病菌がモデル実験植物のシロイヌナズナに感染するかどうかを調査した。100 種類以上のシロイヌナズナの生態型について詳細な解析を行った結果、アブラナ炭疽病菌に対して感受性 (Col-0, Ler-0 など) と抵抗性 (Ws-2 など) を示す生態型を得た。これらの生態型を用いてアブラナ炭疽病菌に対する R 遺伝子を探索した結果、炭疽病菌に対する抵抗性の発動のためには、ゲノム上で隣接して存在する 2 つの NLR 型の R 遺伝子 *RPS4* と *RRS1* の両方が必要であることが明らかとなり、これらをデュアル R タンパク質システムと名付けた (図 2) (Narusaka *et al.*, 2009; Birker *et al.*, 2009)。一方で、*RPS4* は *Pseudomonas syringae*, *RRS1* は *Ralstonia solanacearum* に対して単

2 種の R タンパク質ペアが 5 種の病原体を認識

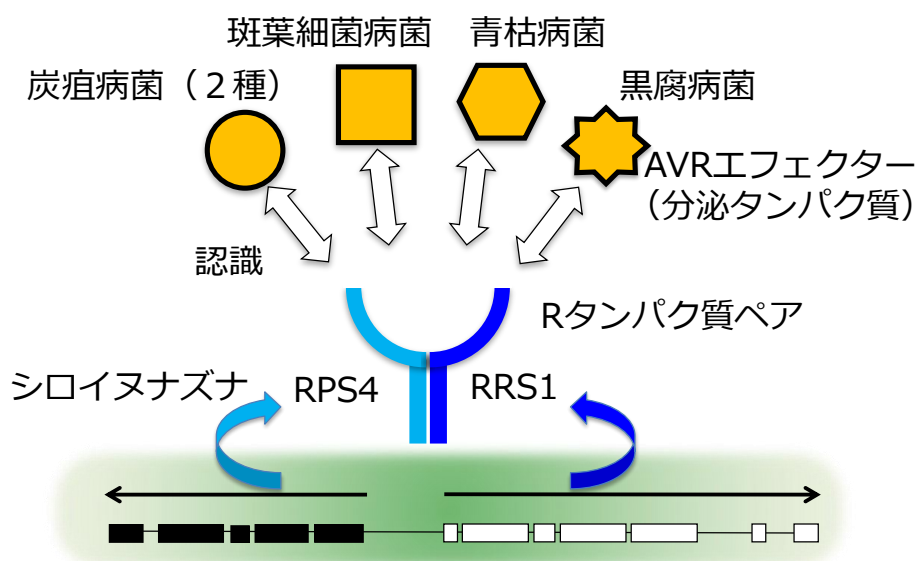


図 2. デュアル R タンパク質システムの模式図

独で機能する R 遺伝子としてそれぞれ報告されていた (Gassmann *et al.*, 1999; Deslandes *et al.*, 2002)。しかしながら、私たちは *P. syringae* および *R. solanacearum* に対しても *RPS4* と *RRS1* の両方が必要であることを明らかにした (Narusaka *et al.*, 2009)。さらに驚くべきことに、2 つの R タンパク質 (*RPS4* と *RRS1*) は、これら以外にも、ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* および、黒腐病菌 *Xanthomonas campestris* の攻撃を認識して抵抗反応を起動しており、本システムは少なくとも異なる 5 種の病原体の認識に関わっていることが明らかとなった (Narusaka *et al.*, 2013; Debieu *et al.*, 2016)。

また、本 NLR ペア (*RPS4/RRS1*) は科学的に興味深いいくつかの特徴を有している。前述の ETI における R タンパク質のエフェクター認識モデルに従うと *RPS4/RRS1* による病原体の受容と免疫誘導は、*RRS1* が有する WRKY ドメインがデコイとして機能しエフェクターを受容する。次いで、*RRS1* の変化を *RPS4* が認識し、免疫シグナルは EDS1/PAD4 および EDS1/SAG101 を経て、それぞれヘルパー NLR である ADR1 および NRG1 に伝達され、過敏感反応を誘導すると考えられている (Narusaka *et al.*, 2016; Bayless and Nishimura 2020; Dongle and Parker 2021)。このように、異なる 2 つの NLR である *RPS4/RRS1* ペアがセンサ

—NLR となり、複数の病原体（異なるエフェクター）を認識する。

4. *R*遺伝子ペアの育種への利用

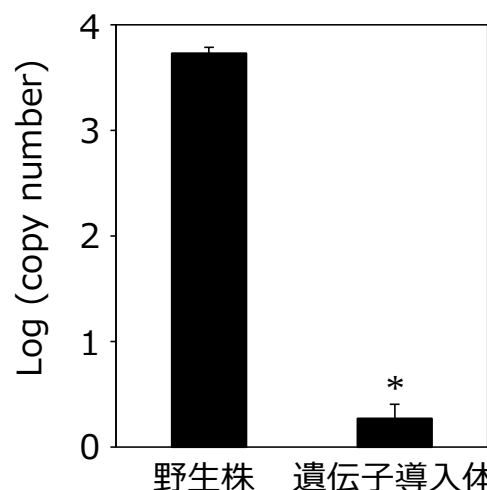
作物の育種においては、様々な病害に対する抵抗性を付与することが生産性を向上させる上での重要な課題である。従来の育種では、同種または交配可能な近縁種の植物から *R* 遺伝子を発見し、作物に導入することが伝統的に行われてきた。多くの *R* 遺伝子は進化系統上離れた植物に単独で導入しても機能しないことが知られている。生物分類は大きい方から目→科→属→種の順となっている。科が異なれば相当な遠縁であり、*R* 遺伝子が機能しないとされていた。そのため、(1) 現在までに発見された *R* 遺伝子は植物の科 (family) を超えて機能しない、(2) 作物への *R* 遺伝子の単独の導入により矮化または抵抗性の機能不全を生じ病害抵抗性作物の分子育種に利用できないことが問題であり、モデル実験植物で得た知見を実用植物へ応用することが困難であった。私たちはペアで機能する *R* 遺伝子を導入することで、本課題を解決できるかどうかを検証するため、アブラナ科のシロイヌナズナ由来の2つの *R* 遺伝子 (*RPS4* と *RRS1*) を、アブラナ科 (ナタネ、コマツナ)、ナス科 (トマト、タバコ) およびウリ科 (キュウリ) 作物に同時に導入した。その結果、これら遺伝子導入体は正常に生育し、かつ、複数の病害 (アブラナ炭疽病、ウリ類炭疽病、トマト斑葉細菌病、青枯病) に抵抗性を示すことを明らかにした (図 3)

(Narusaka *et al.*, 2013; Narusaka *et al.*, 2014)。これに対して、それぞれ単独で *R* 遺伝子を導入した場合は抵抗性を付与できず、トマトにおいては果実が矮小化し、不良種子しか形成しなかった。これはシロイヌナズナ由来の *R* 遺伝子ペアを作物へ導入し、病害抵抗性作物を創製できた世界初の事例であり、*R* 遺伝子は科を超えて機能しないという定説を覆した。特に、これら遺伝子を導入したキュウリとナタネについては、海外での実用化を目的として、海外の隔離圃場で栽培試験を行った。その結果、遺伝子導入体は市販品種と同等以上の生育および成果物の収量を示し、かつ、病害に対して強い耐性を示した (図 3)。また、本形質はメンデル遺伝し、T7 世代においても強い炭疽病抵抗性を示した。

近年、様々な植物のゲノムが解読され、各植物のゲノムに存在する *R* 遺伝子ペア



野生株 遺伝子導入体
ウリ類炭疽病菌を接種6日後の病徴



接種6日後のウリ類炭疽病菌の感染量

図3. 2つの異なる *R* 遺伝子 (*RPS4* と *RRS1*) 導入作物の実証試験

遺伝子導入キュウリに炭疽病菌を接種して6日後の病徴 (上)、菌の感染量 (キュウリ中の炭疽病菌のハウスキーピング遺伝子を定量した) (下)。*は統計学的に有意な差があった。

の存在が明らかになってきている。これら *R* 遺伝子を収集し、遺伝子組み換えに依らない伝統的な育種の遺伝子マーカーとすることで、*R* 遺伝子を遺伝子マーカーとした *R* 遺伝子の集積による効率的な品種育成システムの構築を試みた。その結果、タンパク質のファミリー、ドメイン、モチーフに関する様々なデータベースを統合したプログラム (InterPro; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を介し、植物のゲノム情報から *R* 遺伝子および *R* 遺伝子ペアを検索・抽出する新規検索プログラム (アプリケーション) である「網羅的なタンパク質モチーフ検索プログラム Ex-DOMAIN (exhaustive domain and motif annotator using InterProScan)」の開発に成功した (Narusaka *et al.*, 2018)。本プログラムにより、モデル実験植物シロイヌナズナ (Col-0) において予測される *R* 遺伝子 (*NLR* 遺伝子) は 158 個で、そのうち約 1/3 がペアを形成していた (参照データベース; <https://www.araport.org>)。また、キュウリにおいては、予測される *R* 遺伝子は 53 個で、約 1/5 のペアが予想された (参照データベース; <http://www.cucurbitgenomics.org/organism/2>)。本プログラムにより、ゲノムが解読された全ての植物の *R* 遺伝子および *R* 遺伝子ペアの検索が可能となり、これらを遺伝子マーカーとした病害抵抗性作物の育種技術の開発が促進することが期待される。本プログラムは、ゲノムが解読された全生物種のタンパク質のモチーフを検索することが可能である。

5. 炭疽病菌を認識する複数の *R* タンパク質の発見

私たちは、炭疽病菌に対する宿主植物の抵抗性機構について研究を進めた結果、宿主植物シロイヌナズナのゲノム上には、新たな *R* 遺伝子座 *RCH1* (Recognition of *C. higginsianum*) が 4 番染色体に座乗することを独自に発見した。興味深いことに、*R* 遺伝子ペア *RPS4/RRS1* および *RCH1* の 2 セットの *R* タンパク質を有するシロイヌナズナ生態型 Eil-0 は、1 セットしかもたない生態型に比べて強力な抵抗性を示した (図 4)。このことから、それぞれの *R*

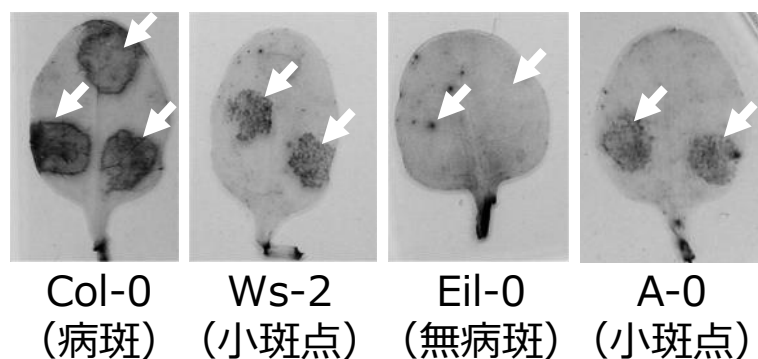


図 4. シロイヌナズナにアブラナ炭疽病菌を接種して 6 日目の病斑 (菌糸および死細胞をトリパンブルー染色)

Col-0 は菌が感染。

Ws-2, A-0 は菌の侵入を表皮細胞で阻止。

Eil-0 は菌の侵入を付着器直下で完全に阻止。

タンパク質が異なる AVR エフェクターを認識し、それぞれ独立した防御シグナル伝達系により炭疽病菌に対する抵抗性を発揮する作業仮説が考えられた (図 5)。本作業仮説を証明するため、私たちは *R* 遺伝子座 *RCH1* のみを有するシロイヌナズナ生態型 A-0 (仮称) を発見し、A-0 の全ゲノムの解読および RNAseq 解析による推定転写産物を特定した。具体

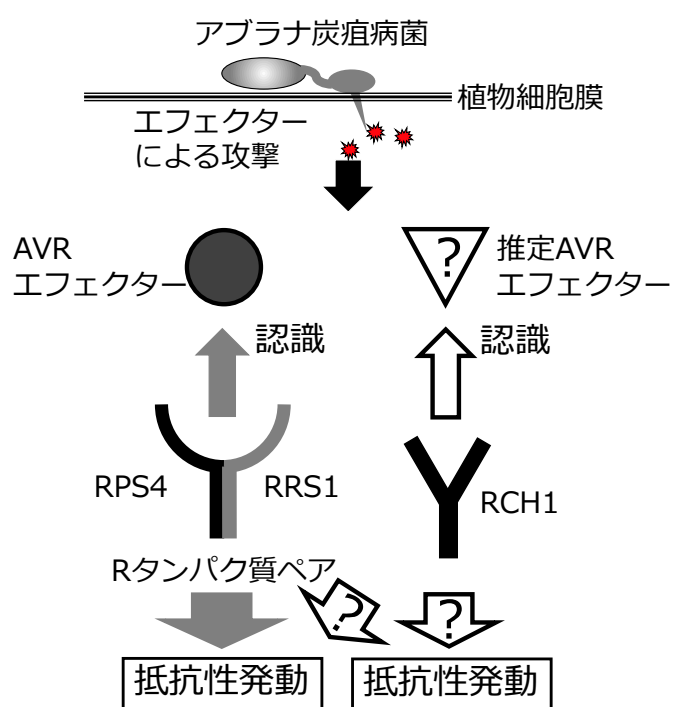


図 5. R タンパク質による AVR エフェクターの認識と抵抗性発動の概略図

とを明らかにした (表 1) . 生態型 Col-0 はアブラナ炭疽病菌に感受性を示し, 抵抗性の Ws-2 は 5 番染色体の *RPS4/RRS1*, *RPS4B/RRS1B* が *R* 遺伝子として機能する. 一方, Eil-0 はこれらに加えて 4 番染色体にも *R* 遺伝子座 (*RCH1*) が存在することを明らかにした. また, ダイコン炭疽病菌に対しては Bay-0 が感受性を示し, Col-0, Eil-0, Ws-2 はダイコン炭疽病菌に対する *R* 遺伝子 (*RCI1* : Recognition of *C. incanum*) が存在することを発見した (Gan *et al.*, 2016) . 本結果から, 異なる炭疽病菌に対して少なくとも 6 種の *R* 遺伝子が関与しており, 適応共進化においてどのようにこれらを獲得し, それぞれの *R* タンパク質がどのように抵抗性に寄与しているのかを明らかにすることを試みている.

表 1. 炭疽病菌に対する感受度と *R* 遺伝子の関係

シロイヌナズナ 生態型	アブラナ炭疽病菌				ダイコン炭疽病菌	
	感受度	R遺伝子			感受度	R遺伝子
		RPS4/RRS1	RPS4B/RRS1B	RCH1		
Col-0 (U.S.A.)	感受性	欠損	○	欠損	抵抗性	○
Ws-2 (Russia)	抵抗性	○	○	欠損	抵抗性	○
Eil-0 (Germany)	抵抗性	○	○	○	抵抗性	○
A-0	抵抗性	欠損	—	○	—	—
Bay-0 (Germany)	抵抗性	○	—	—	感受性	欠損

— : 未解析

的には, 不活性型の *RRS1-S* と活性型の *RCH1* を有しアブラナ炭疽病菌に抵抗性を示すシロイヌナズナ生態型 A-0 および, 不活性型の *RRS1-S* と *RCH1-S* を有しアブラナ炭疽病菌に感受性を示す Col-0 などを用いて, *RCH1* 遺伝子座の特定を試みた. その結果, A-0 の 4 番染色体にアブラナ炭疽病菌を認識する抵抗性遺伝子 *RCH1* が存在することをつきとめた. 現在, 取得した遺伝子について解析を進めている.

私たちは, シロイヌナズナの生態型によってアブラナ炭疽病菌およびダイコン炭疽病菌 (*Colletotrichum incanum*) に対する感受度が異なり, 抵抗性の生態型にはそれぞれの炭疽病菌に対応する *R* 遺伝子 (ペア) が存在すること

6. 最後に

現在、作物の病害の防除は殺菌性の化学合成農薬に大きく依存しているが、病原体の薬剤耐性の発達が深刻な課題となっている。この問題に対処するため、農林水産省が掲げる「みどりの食料システム戦略」において、植物が本来備えている病気に対する抵抗力（植物の免疫力）を活用した効率的な病害抵抗性作物の育種技術の開発や抵抗性誘導剤（プラントアクチベーター）の創農薬などの新たな病害防除技術の開発が推進されている。これらの目標が達成されれば、化学合成農薬の使用量を削減でき、病害虫の薬剤耐性の進展を抑制することが可能となる。これにより、持続可能な農業が推進され、食料安全保障を含む多様な SDGs（持続可能な開発目標）の達成に寄与することが期待される。

R 遺伝子ペアの発見により、植物の免疫系は動物と同様に、わずかな *R* 遺伝子の組み合わせによって、多様な病原体を認識し、防御反応を発動していることが明らかになった。今後、この *R* 遺伝子ペアを利用した作物保護技術のさらなる研究と社会実装により、殺菌性の化学合成農薬の使用量削減や農業の生態系への負荷を軽減し、持続可能な循環型農業の推進に寄与する。

謝辞

本研究の一部は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」および、JSPS 科研費(JP19K05961, JP20K05967, JP22K05568, JP23K05159)の支援を受けて行った。

引用文献

- Bayless A. M. and Nishimura M. T. (2020) Enzymatic Functions for Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Proteins in the Plant Immune System. *Front. Genet.* 11: 539.
- Birker D., Heidrich K., Takahara H., Narusaka M., Deslandes L., Narusaka Y., Reymond M., Parker J.E. and O'Connell R. (2009) A locus conferring resistance to *Colletotrichum higginsianum* is shared by four geographically distinct *Arabidopsis* accessions. *Plant J.* 60: 602-613.
- Debieu M., Huard-Chauveau C., Genissel A., Roux F. and Roby D. (2016) Quantitative disease resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* involves an *Arabidopsis* immune receptor pair and a gene of unknown function. *Mol. Plant Pathol.* 17:510-20.
- Deslandes L., Olivier J., Theulières F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J. and Marco, Y. (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2404-2409.
- Dongus J. A. and Parker J. E. (2021) EDS1 signalling: At the nexus of intracellular and surface receptor immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 62: 102039.
- Flor, H. H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-69.
- Gan P., Narusaka M., Kumakura N., Tsushima A., Takano Y., Narusaka Y. and Shirasu K. (2016) Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles. *Genome Biol. Evol.* 8:1467-1481.
- Gassmann W., Hinsch M.E. and Staskawicz B.J. (1999) The *Arabidopsis* *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J.* 20: 265-277.
- 1001 Genomes Consortium. (2016) 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 166: 481-491.
- Narusaka M., Shirasu K., Noutoshi Y., Kubo Y., Shiraiishi T., Iwabuchi M. and Narusaka Y. (2009) *RRS1* and *RPS4* provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J.* 60: 218-226.
- Narusaka M., Kubo Y., Hatakeyama K., Imamura J., Ezura H., Nanasato Y., Tabei Y., Takano Y., Shirasu K. and

- Narusaka Y. (2013) Interfamily transfer of dual NB-LRR genes confers resistance to multiple pathogens. *PLoS ONE* 8: e55954.
- Narusaka M., Hatakeyama K., Shirasu K. and Narusaka Y. (2014) *Arabidopsis* dual resistance proteins, both *RPS4* and *RRS1*, are required for resistance to bacterial wilt in transgenic *Brassica* crops. *Plant Signal. Behav.* 9: e29130.
- Narusaka M., Toyoda K., Shiraishi T., Iuchi S., Takano Y., Shirasu K. and Narusaka Y. (2016) Leucine zipper motif in *RRS1* is crucial for the regulation of *Arabidopsis* dual resistance protein complex *RPS4/RRS1*. *Sci. Rep.* 6:18702.
- Narusaka M., Yunokawa H. and Narusaka Y. (2018) Efficient identification of NLR by using a genome-wide protein domain and motif survey program, Ex-DOMAIN. *Plant Biotech.* 35:177-180.
- O'Connell R.J., Thon M.R., Hacquard S., Amyotte S.G., Kleemann J., et al. (2012) Life-style transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Gen.* 44: 1060-1065.
- Sato, T. and Moriwaki, J. (2009) Causal Fungi of Plant Anthracnose (1). *Microbiol. Cult. Coll.* 25: 27–32.
- Weyer A.-L. Van., Monteiro F., Furzer O. J., Nishimura M. T., Cevik V., Witek K., Jones J.D.G., Dangl J.L., Weigel D. and Bemm F. (2019) A species-wide inventory of NLR genes and alleles in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 178: 1260–1272.

アミノ酸を介した植物保護細菌の制御

竹内 香純 *

Takeuchi, K. *

Molecular regulation of functions of plant-protecting bacteria by amino acids in the rhizosphere

Abstract

Root-colonizing *Pseudomonas* spp. exhibiting plant protective efficacies produce a wide variety of secondary metabolites and extracellular enzymes that contribute to the suppression of plant pathogens in the rhizosphere. Our genomic and metabolomic studies on *Pseudomonas protegens* CHA0 demonstrated that intracellular low-molecular weight effectors, such as guanosine tetraphosphate, fumarate and γ -aminobutyrate (GABA), function as important signals in niche adaptation to plant roots. Extra-and intracellular levels of fumarate and succinate were found to positively correlate with the regulation of secondary metabolism. However, the *fumA* mutant, which lacks fumarase and thus, accumulates fumarate did not exhibit higher plant protective efficacies than the wild type. These findings suggest the presence of other signals that induce biocontrol activity. We then investigated the role of amino acids in the plant protective trait of *P. protegens* towards Pythium damping off and root rot in cucumber. Among the 11 amino acids tested, glutamate showed positive effect on the plant protection efficacy of *P. protegens*. The promoter activity of the genes involved in the regulation of functions were characterized in detail, and we found that the activities were regulated in response to exogenous glutamate in a dose-dependent manner. In terms of effective and ecological applications of pseudomonads, regulation of root-colonizing pseudomonads in the rhizosphere by using extracellular signals that affect biocontrol activity will lead to advances in the research on plant-microbe interactions.

Key words: *Pseudomonas protegens*, rhizosphere, Gac/Rsm signal transduction pathway, secondary metabolism, amino acids

* 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 (*Corresponding author: kasumit@affrc.go.jp)

1. はじめに

土壌病害を引き起こす病原微生物の防除には困難が伴うが、過剰な化学農薬の使用は薬剤耐性菌の出現を招くなど課題も多い。特に、ピシウム属菌、フザリウム属菌、リゾクトニア属菌などの植物病原糸状菌および卵菌が引き起こす病害は経済的ロスも大きく、難防除とされている (Janvier et al., 2007, Arora et al., 2021)。こうした背景を元に、植物の根圏に生息する有用細菌 (Plant growth-promoting rhizobacteria: PGPR, Weller 1988) をはじめとする生物防除の研究が発展した。

著者らはキュウリなどに立枯病を引き起こす *Pythium ultimum* を対象として、植物保護細菌と名付けた *Pseudomonas protegens* (非病原性シュードモナス属細菌の一種) を用いた病害防除に取り組んでいる。*P. protegens* は以前は *P. fluorescens* と学名を同じくしていたが、“plant-protecting bacteria” をその名の由来として独立した。スイス西部の病害抑止土壌から単離された CHA0 株が代表的なモデル系統として知られている (Stutz et al., 1986, Ramette et al., 2011)。*P. protegens* とその近縁系統は、産生する二次代謝産物のバリエーションが豊富なものが多く、二次代謝産物の中には病原微生物の増殖を抑える抗菌性物質として作用するものが含まれており、このことが根圏における本細菌の環境適応能力、即ちニッチの獲得につながっている (Kupferschmied et al., 2013)。そのほかの病害防除のメカニズムとして、病原微生物との競合に強いこと、宿主植物に抵抗性を付与すること、宿主植物の生育を促進すること (栄養素の供給によるバイオマス増産への寄与) などが挙げられる。研究の発展とともにこうした特徴が複合的に寄与することも明らかになりつつある。例えば二次代謝産物の一つであるシデロフォア (pyoverdine, pyochelin など) は鉄キレート剤として機能するため、根圏における病原微生物との競合 (鉄の奪い合い) の際に有効であることや、二次代謝産物の中には宿主植物に対する抵抗性を付与するものもあること、また植物ホルモンとして機能するものが含まれるためにバイオマス増産につながっていること等々である (Pieterse et al., 2014, Zboralski and Fillion, 2020)。いずれにしても二次代謝産物のバリエーションの豊富さが本細菌の強みの根底にある。

著者らは植物保護細菌の機能を制御することにより本細菌の有効利用につなげたいと考え、機能に関わる因子を明らかにすべくメタボローム解析や変異株解析を行ってきた。その過程で様々な一次代謝産物が機能制御のシグナルとして関与することを明らかにした。本総説では、それらの結果と利用法について紹介する。

2. 植物保護細菌 *Pseudomonas protegens* の機能制御メカニズム

P. protegens の植物保護能力に寄与する抗菌性物質として、主に 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)、pyrrolnitrin、pyoluteorin などが知られている。そのほか、菌体外酵素である AprA プロテアーゼやキチナーゼも産生されており、これらが土壌中の病原微生物の生育を抑制している (Haas and Keel, 2003)。特に DAPG は *P. protegens* の代表的な抗菌性物質として位置づけられるが、抗菌性物質としての機能のほかにも植物に対する抵抗性誘導に寄与することが報告されている (Iavicoli et al., 2003)。

抗菌性物質や菌体外酵素はその生産コストを考慮すると、周囲に競合相手がいない場合など必要のない状況では細菌自身にとって却って負担となる。そのため Gac/Rsm シグナル伝達系と称される制御系により緻密に調節されている (Gac は Global activator、Rsm は Regulator of secondary metabolism の略) (Lapouge et al., 2008, Kidarsa et al., 2013, Valentini and

Filloux, 2016)。通常は抗菌性物質などの合成酵素遺伝子 (mRNA) のプロモーター領域に RNA 結合タンパク質 RsmA/E (リプレッサー) が結合し、発現が抑制されている。その結合部位には共通して GGA モチーフとよばれる特異的な配列 (ANGGAN) が存在する (Reimmann et al., 2005, Lapouge et al., 2008)。一方、環境の変化に応じ GacS/GacA 二成分制御系が活性化すると、それに伴い調節型 small RNA の発現量が高まるが、調節型 small RNA は上述の GGA モチーフに富んでおり、複数の stem-loop 構造を取るためリプレッサーと結合しやすい。すなわち mRNA の GGA モチーフと競合するため、結果として合成酵素遺伝子の発現が促進される。Gac/Rsm シグナル伝達系は *Pseudomonas* 属細菌を含むガンマプロテオバクテリア綱に共通したメカニズムであり、細菌種によってそれぞれのホモログが見出されているが、その発見の元となった *P. protegens* CHA0 の場合、調節型 small RNA は 3 つ (rsmX, Y, Z) 存在し、サイズはいずれも 120 nt 前後である。細菌が宿主生物や様々な環境の中で自身を適応させていく際に、調節型 small RNA を用いて一括制御を行うことは、個々の mRNA を制御して対応するよりもはるかに効率がよいといえる。

3. 植物保護細菌の機能制御に関わる代謝産物

P. protegens の small RNA と各種合成酵素遺伝子は発現の正負が連動していることから、調節型 small RNA の発現量は植物保護細菌の機能を明らかにする上で有効な指標になり得ると考えた。植物保護細菌の機能制御に向けて、その発現に影響する代謝産物を特定すべくメタボローム解析や変異株解析を行い、いくつか鍵となる代謝産物を明らかにした (表)。例えば TCA サイクルの中間体であるフマル酸やコハク酸は、調節型 small RNA の発現および抗菌性二次代謝産物の生産に正に作用すること、逆にピルビン酸は負に作用することが明らかとなった (Takeuchi et al., 2009)。そのほか細菌特有の警告シグナル (alarmone) として機能する guanosine tetraphosphate (ppGpp) が、植物保護細菌においては抗菌性二次代謝産物の生産に正に作用することを明らかにした。詳細については平成 26 年度の本会にて紹介しており、ここでは割愛させていただく。

表. 植物保護細菌の機能制御に関わる代謝産物

	機能	文献
フマル酸	調節型 small RNA の発現 (正)、 抗菌性二次代謝産物の生産 (正)	Takeuchi et al., 2009
コハク酸	調節型 small RNA の発現 (正)	同上
ピルビン酸	調節型 small RNA の発現 (負)、 抗菌性二次代謝産物の生産 (負)	同上
GABA*	根圏定着能 (正)	Takeuchi, 2018
ppGpp*	調節型 small RNA の発現 (正)、 植物保護効果 (正)	Takeuchi et al., 2012
グルタミン酸	キチナーゼ (遺伝子発現・酵素活性) (正)、 植物保護効果 (正)	Takeuchi et al., 2023

* 内因性シグナルとしての機能を示す。

各種変異株を用いたメタボローム解析の結果から、非タンパク質構成アミノ酸である GABA (γ -aminobutyrate) に興味をもたれた。GABA は、その異化に関わるアミノ基転移酵素 (GABA-transaminase, GABA-T) の発現が上述の Gac/Rsm シグナル伝達系によって制御されており、一次代謝産物でありながら菌体内濃度が緻密に調節されていることが明らかとなった (Takeuchi et al., 2012, Takeuchi, 2018)。具体的には、GABA-T をコードする遺伝子 (*gabT*) の上流のプロモーター領域に上述の GGA モチーフが見出されており、GacA 変異株においては野生株と比較して当該遺伝子の発現量が低下するとともに、実際の GABA-T 活性も失われており、菌体内における GABA の濃度が亢進した。さらに GGA モチーフに変異を入れると、一連の制御がキャンセルされることも明らかとなり、この配列の重要性が支持された。GABA は *P. syringae* の HR 誘導能や走化性に関わることが報告されており (Park et al., 2010, Tumewu et al., 2020)、植物病原細菌においても植物との相互作用の局面で重要なシグナル物質として機能することが推察される。

植物保護細菌の機能を発揮する上で、これらの一次代謝産物がシグナル物質として作用すると考えられた。そこで調節型 small RNA の発現に正に作用するフマル酸に着目し、フマル酸高蓄積系統として異化に関わる代謝酵素 (fumarase) の欠損変異株を作出した。この変異株では野生株と比較し植物保護効果が高まることを期待したが、抗菌性は亢進したものの、実際の保護効果は低下した (Takeuchi et al., 2009)。過剰な抗菌性物質生産が細菌に負の影響を及ぼした結果と推察される。一方、GABA の高蓄積系統として作出した上述の *gabT* 遺伝子の欠損変異株では植物根面への定着能が亢進しており、GABA が定着の際のシグナル物質として機能することが示されたが、植物保護効果を高めるまでには至らなかった (Takeuchi, 2018)。

4. アミノ酸による植物保護細菌の制御

植物保護細菌の効率的な制御のためには、他の一次代謝産物の効果についても明らかにすることが有効と考えた。候補物質として、これまで植物保護細菌の機能との関係が不明であった必須アミノ酸を対象とし、植物保護能力に作用するアミノ酸の同定を試みた。トマト青枯病においては、ヒスチジンなどのアミノ酸が植物に対し病害抵抗性を誘導することが報告されており (Seo et al., 2016)、植物保護細菌とアミノ酸の併用効果に興味をもたれた。各種アミノ酸水溶液 (10 mM) を *P. protegens* 懸濁液とともに土壤に添加し、*Pythium ultimum* 感染土壤における病害防除効果をキュウリ幼苗の植物重量の比較により評価した。今回、供試したアミノ酸 11 種類 (いずれも L 体) の中ではグルタミン酸 (L-Glu) のみに顕著な効果が認められた (図)。グルタミン酸単独処理では病害防除効果が認められず、*P. protegens* との組み合わせにより効果が認められたことから、グルタミン酸が *P. protegens* の機能を高めていると考えられた (Takeuchi et al., 2023)。

グルタミン酸と *P. protegens* の機能制御のリンクとして、上述の Gac/Rsm シグナル伝達系に対してグルタミン酸が正に作用することが推測された。*P. protegens* CHA0 株を用いて詳細な解析を行ったところ、外因性のグルタミン酸の処理により調節型 small RNA (*rsmZ*) の発現が亢進することが明らかとなった。さらにグルタミン酸応答性の遺伝子を網羅的に調べるため、*P. protegens* にグルタミン酸処理を行ったサンプルより RNA を抽出し RNA Seq 解析に供した。無処理区との比較解析を行ったところ、Gac/Rsm シグナル伝達系の

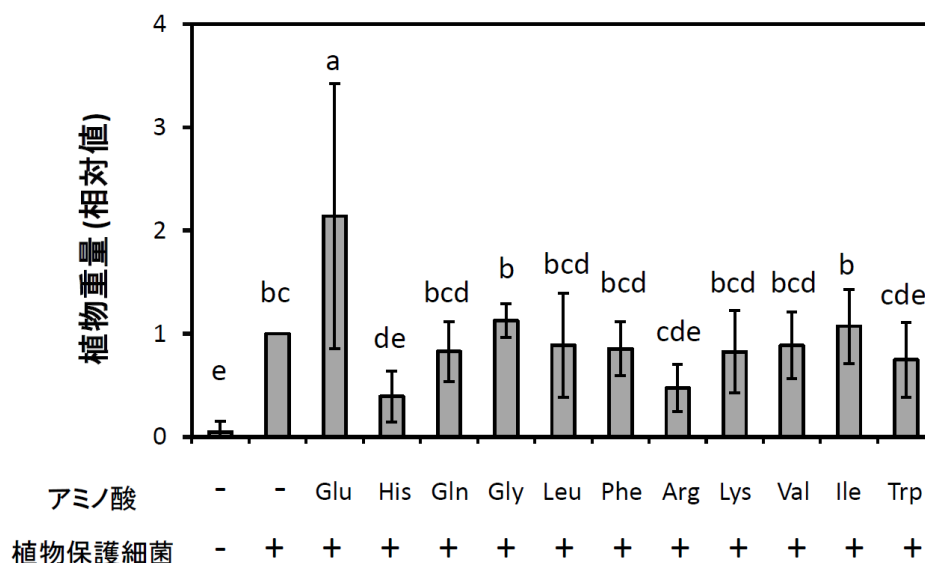


図. ピシウム菌感染土壌におけるキュウリ幼苗の植物重量の比較

土壌中にピシウム菌が蔓延する環境下でキュウリ幼苗を2週間栽培し、植物重量を比較したところ、植物保護細菌 (*Pseudomonas protegens* Cab57) 処理区で重量の回復がみられ、グルタミン酸 (Glu) を併用するとさらに効果が高まった。グラフ中、異なるアルファベット間には5%水準で有意差があることを示す。

制御下にあるとされる抗菌性二次代謝産物の合成酵素遺伝子のクラスターの一部の発現が亢進することが明らかとなった。なお、反対に発現量が低下したのものとして、ヒスチジン代謝に関わる遺伝子群などが含まれていた。ヒスチジン代謝の関連性については現在のところ不明であるが、代謝バランスの変化などに興味をもたれる。

グルタミン酸処理により亢進した遺伝子の中にはキチナーゼ関連遺伝子群 (*cbp-chiC*, *cbp* は chitin-binding protein を、*chiC* はキチナーゼをコードする) や環状リポペプチド orfamide (orphan 遺伝子クラスター産物) の遺伝子群などが含まれていた。そのほか DAPG の合成酵素遺伝子群なども亢進したが、培養上清中の DAPG の濃度はグルタミン酸処理により低下しており、相関関係がみられなかった。当該化合物の培地中での安定性が低いことなどが原因と考えられる。

キチナーゼ遺伝子群のプロモーター領域に上述の GGA モチーフが見出されたことから詳細に調べることにした。GGA モチーフの特定により、他の抗菌性二次代謝産物と同様にキチナーゼ関連遺伝子群の発現も Gac/Rsm の制御下にあることが推測された。そこで当該プロモーター領域を *lacZ* 遺伝子の upstream に連結し活性を調べたところ、GacA 変異株では発現量が低下しており、培養上清におけるキチナーゼ活性も失われたことから、Gac/Rsm の制御下にあると考えられた。次に当該プロモーター活性に対するグルタミン酸の影響を調べたところ L-Glu の濃度依存的に活性が亢進しており、RNA Seq 解析の結果が支持された。なお、D-グルタミン酸 (D-Glu) を処理した場合でも同様に濃度依存的にプロモーター活性が亢進した (Takeuchi et al., 2023)。

他のアミノ酸についても当該プロモーター活性に対する影響を調べたところ、ヒスチジンなど活性に影響を及ぼさないアミノ酸が大半であったが、トリプトファンにグルタミン

酸と同様の効果が認められた。上述のとおりトリプトファンにはグルタミン酸のように植物保護効果を高める機能は見出せなかったため、キチナーゼ以外の要因も植物保護細菌の機能向上に関与することが示唆された。トリプトファンは植物および植物保護細菌の双方の代謝経路に共通してインドール酢酸の前駆体となることを考えると、根圏を制御する上で鍵となるアミノ酸の一つともいえる。

5. 最後に

グルタミン酸は植物・微生物間相互作用研究において、これまでも植物側の防御応答遺伝子の発現を誘導するなど病害応答の局面での機能が報告されている (Goto et al., 2020)。イネにおいては植物側のキチナーゼ遺伝子の発現を誘導することも確認されており (Kadotani et al., 2016)、植物側、細菌側問わず病原菌の存在を知らしめる病害応答のシグナルとして機能することが推察される。今回、グルタミン酸単独ではキュウリ立枯病に対する防除効果を示さなかった点については、キュウリ幼苗に対してはそのような効果がないのか、あるいは防御応答遺伝子の発現誘導の効力を上回る形で土壤中の病害が蔓延し、植物が罹病したことなどが理由として考えられる。

アミノ酸と細菌制御に関する報告事例として、バイオフィーム形成との関係にも興味もたれる。D 体アミノ酸のいくつかは、*Bacillus* 属細菌、*Staphylococcus* 属細菌、*Pseudomonas aeruginosa* においてバイオフィーム形成に負に作用することが報告されており (Leiman et al., 2013, Sanchez et al., 2014)、医療の場面などバイオフィームが除去されるべき構造体である場合には、その有効な利用法も提案されている。

根圏における代謝産物のバランスを整えることは植物保護細菌の制御に有効と考えられる。植物保護細菌の生態を理解するためには、これまでの植物・微生物間の相互作用研究にとどまらず、根から滲出される代謝産物のバランスなども根圏フロラの最適解を導き出す上で大きな要因となり得る。植物保護細菌のフィールドでの利活用に向けてこうした情報を生かしていきたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、農業・食品産業技術総合研究機構 瀬尾茂美博士、小木曾真佐代博士、宇都宮大学 諸星知広博士をはじめ、多くの方々にご協力いただいた。ここに深く謝意を表する。本研究の一部は、科研費 (18H02209, 21H02200) の助成、ならびに NARO イノベーションプログラムによる支援を受けたものである。

引用文献

- Arora, H., Sharma, A., Sharma, S., Haron, F. F., Gafur, A., Sayyed, R. Z., Datta, R. (2021) *Pythium damping-off and root rot of Capsicum annuum L.: Impacts, diagnosis, and management. Microorganisms* 9: 823.
- Goto, Y., Maki, N., Ichihashi, Y., Kitazawa, D., Igarashi, D., Kadota, Y., Shirasu, K. (2020) Exogenous treatment with glutamate induces immune responses in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 33: 474–487.
- Haas, D. and Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 117–153.

- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Métraux, J. P. (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 851–858.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C. (2007) Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol. Biochem.* 39: 1–23.
- Kadotani, N., Akagi, A., Takatsuji, H., Miwa, T., Igarashi, D. (2016) Exogenous proteinogenic amino acids induce systemic resistance in rice. *BMC Plant Biol.* 16: 60.
- Kidarsa, T. A., Shaffer, B. T., Goebel, N. C., Roberts, D. P., Buyer, J. S., Johnson, A., Kobayashi, D. Y., Zabriskie, T. M., Paulsen, I., and Loper, J.E. (2013) Genes expressed by the biological control bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 on seed surfaces under the control of the global regulators GacA and RpoS. *Environ. Microbiol.* 15: 716–735.
- Kupferschmied, P., Maurhofer, M., Keel, C. (2013) Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Front. Plant Sci.* 4: 287.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H.-T., and Haas, D. (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.* 67: 241–253.
- Leiman, S. A., May, J. M., Lebar, M. D., Kahne, D., Kolter, R., Losick, R. (2013) D-Amino acids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. *J. Bacteriol.* 195: 5391–5395.
- Park, D. H., Mirabella, R., Bronstein, P. A., Preston, G. M., Haring, M. A., Lim, C. K., Collmer, A., Schuurink R. C. (2010) Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence. *Plant J.* 64: 318–330.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., Bakker, P. A. H. M. (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 347–375.
- Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J.M., Défago, G., Sutra, L., Moënne-Loccoz, Y. (2011) *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 180–188.
- Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., and Haas, D. (2005). Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 187: 276–285.
- Sanchez, C. J., Akers, K. S., Romano, D. R., Woodbury, R. L., Hardy, S. K., Murray, C. K., Wenke, J. C. (2014) D-Amino acids enhance the activity of antimicrobials against biofilms of clinical wound isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 4353–4361.
- Seo, S., Nakaho, K., Hong, S. W., Takahashi, H., Shigemori, H., Mitsuhashi, I. (2016) L-Histidine induces resistance in plants to the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* partially through the activation of ethylene signaling. *Plant Cell Physiol.* 57: 1932–1942.
- Stutz, E.W., Défago G, Kem H (1986) Naturally occurring fluorescent Pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology* 76: 181–185.
- Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J. A., Haas, D. (2009) Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* 284: 34976–34985.
- Takeuchi, K., Yamada, K., Haas, D. (2012) ppGpp controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway sustains biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 25: 1440–1449.
- Takeuchi, K., Noda, N., Someya, N. (2014) Complete genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas protegens* Cab57 discovered in Japan reveals strain-specific diversity of this species. *PLoS ONE* 9: e93683.
- Takeuchi, K. (2018) GABA, a primary metabolite controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway, favors a planktonic over a biofilm lifestyle in *Pseudomonas protegens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31: 274–282.
- Takeuchi, K., Ogiso, M., Morohoshi, T., Seo, S. (2023) Glutamate positively regulates chitinase activity and the biocontrol efficacy of *Pseudomonas protegens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 36: 323–333.

- Tumewu, S. A., Matsui, H., Yamamoto, M., Noutoshi, Y., Toyoda, K., Ichinose, Y. (2020) Requirement of γ -aminobutyric acid chemotaxis for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Microbes Environ.* 35: ME20114.
- Valentini, M., and Filloux, A. (2016) Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J. Biol. Chem.* 291: 12547–12555.
- Weller, D. M. (1988) Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407.
- Zboralski, A. and Fillion, M. (2020) Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18: 3539–3554.

細胞表面受容体による植物免疫システムの進化軌跡

白須 賢*

Shirasu, K.*

Evolutionary trajectory of cell surface receptor-induced plant immune system

Abstract

Plants, as carbon sources, are targets for various organisms, making their recognition mechanisms crucial for survival. The primary recognition method involves receptor proteins on cell surfaces, similar to the innate immune systems in other eukaryotes. Pattern Recognition Receptors (PRRs) detect Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), triggering PAMP (or PRR)-Triggered Immunity (PTI). Plant PRRs, categorized into Receptor-Like Proteins (RLPs) and Receptor-Like Kinases (RLKs), evolve in response to pathogenic pressures. These receptors not only recognize pathogens but also regulate development and reproduction by interacting with plant hormones. After ligand recognition, PRRs initiate a signal cascade involving coreceptors like BAK1 and SOBIR1, and downstream factors such as RLCKs, CDPKs, NADPH oxidases, and MAPKs, leading to transcriptional reprogramming and defense responses. This review highlights the evolutionary trajectory of these immune components and their ancient origins, emphasizing the adaptation and diversification of PRR genes in land plants. Furthermore, it suggests a common origin for immune and developmental receptors, hinting at an evolutionary link between PAMP recognition and developmental signaling pathways.

Key words: PRR, PAMP, RLP, RLK, , Plant immunity

* 理化学研究所環境資源科学研究センター

RIKEN Center of Sustainable Resource Science (*Corresponding author: ken.shirasu@riken.jp)

1. はじめに

植物は自らの周りに存在する生命体をどこまで“見えている”だろうか．光合成をおこなう植物はそれ以外の生命体の炭素源であることから，ありとあらゆる生命体から”攻撃”を受けるはずであり，その認識は植物の生存戦略に大きく関わってくる．また，植物が陸上に進出して以来，周りに存在する生命体は劇的に変わったはずであり，その認識および反応機構も大幅に進化したはずである．では，陸上植物は，どのような生命体をどのようにして認識しているのだろうか．外部生命体の認識は主に細胞表面の受容体タンパク質によっておこなわれていると考えるのが真核生物における自然免疫システムの根本であり，植物も例外ではない（Nürnberg and Brunner, 2002）．病原体由来の物質である病原体関連分子パターン（Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP）は，植物の細胞表面パターン認識受容体（Pattern Recognition Receptor, PRR）によって認識される（Zipfel, 2014）．このような PAMP を認識し PRR によって引き起こされる免疫（Pattern-Triggered Immunity, あるいは PRR-Triggered Immunity, PTI）は，動物，植物，菌類，その他の真核生物に保存されている（Boutrot and Zipfel, 2017）．本総説は，植物における PTI 免疫システムに関係する因子とその進化的な軌跡を考察する．

2. 細胞表面受容体

植物の PRR は，非自己分子である PAMP や自己分子である損傷関連分子パターン（Damage-Associated Molecular Pattern, DAMP）としてのペプチドや，小さなタンパク質，脂質，多糖類などの認識において重要な役割を果たしている（Ngou *et al.*, 2022a）．これらの受容体は，膜貫通ドメインを持つがキナーゼドメインを欠く受容体様タンパク質（Receptor-Like Protein, RLP）と，膜貫通ドメインとキナーゼドメインの両方を持つ受容体様キナーゼ（Receptor-Like Kinase, RLK）に分類されるが，RLP および RLK の種類やそれらをコードする遺伝子数は植物種間で大きく異なり，病原体圧力に応じて進化の過程で拡大してきたと考えられる（Fischer *et al.*, 2016; Ngou, *et al.*, 2022a）．

植物において多くの細胞表面受容体は病原体認識に関与しているが，同様のドメイン構造を持つ多くの受容体が植物ホルモンやホルモン様ペプチドであるフィトサイトカインのような自己分子を認識し，発生および生殖を調節する（He *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2021a）．免疫，発生，および生殖プロセスに関与することが知られている植物の細胞表面受容体には，LRR, G-レクチン，細胞壁結合キナーゼ（WAK），未知機能ドメイン 26（Duf26），L-レクチン，リシンモチーフ（LysM），およびマレクチンを含む 7 種の RLK および RLP がある（Ngou *et al.*, 2024）．そのうち LRR, G-レクチン, WAK, LysM の細胞外ドメインを持つ細胞表面受容体は PAMP を認識することが報告されており，その他の受容体は自己分子や未同定のリガンドを認識する．細胞外ドメインタイプ（LRR, G-レクチン, WAK, Duf26, L-レクチン, LysM, あるいはマレクチン細胞外ドメインのみで TM および KD を欠く）の登場は灰色藻の時代にまで遡る（Ngou *et al.*, 2024）．同様に，RLP タイプ（TM に結合した細胞外ドメイン）は比較的早く，灰色藻および紅藻に見られる．これとは対照的に，RLK タイプ（細胞外ドメインが TM を介し KD と結合している）はより最近になって出現しており，緑藻は WAK-RLK, マレクチン-RLK, および G-レクチン-RLK を持ち，陸上植物になって LysM-RLK, L-レクチン-RLK, および Duf-26-RLK が登場する．

LRR-RLP を除いた 6 つの RLP ファミリーは RLK ファミリー以前に登場することから，

多くの RLK がキナーゼドメインの統合を通じて直接 RLP から進化した可能性を示唆している。RLK が多様な植物系統に存在することを考えると、そのような統合イベントは植物進化のさまざまな段階で発生したと考えられる。あるいは、RLK も RLP と同様に古くから存在し、特定の系統からの消失が時間の経過とともに起こった可能性がある。いずれにせよ、RLP および RLK の両方が、細胞外ドメインから発生し TM さらにキナーゼドメインを取り込むために複数の遺伝子重複およびドメイン交換を経て、その機能的レパートリーを多様化させた可能性が高い。

2. 下流因子の進化軌跡

リガンドの認識後、PRR は SERK (Somatic Embryogenesis, Receptor-like Kinase) ファミリーの一員である BAK1 (BRI1-Associated receptor Kinase) や SOBIR1 (Suppressor Of BIR1) などの共受容体とホモ二量体化やヘテロ複合体形成を行い、下流のシグナル伝達カスケードを開始する (DeFalco and Zipfel, 2021)。活性化された受容体複合体は、細胞質受容体様キナーゼサブグループ VII (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase, RLCK-VII) のメンバーをリン酸化し (Rao *et al.*, 2018)、MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase, MAPKKK) や、CDPK (Calcium Dependent Protein Kinase) の他、カルシウムチャネルである CNGC (Cyclic Nucleotide Gated Channel) および OSCA (Osmotic-Stress-evoked Ca²⁺) や NADPH オキシダーゼ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH oxidase) などの細胞膜関連タンパク質をリン酸化する (DeFalco and Zipfel, 2021)。これらのタンパク質のリン酸化は、細胞質カルシウムの流入や活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の蓄積 (Yoshioka *et al.*, 2003) などによって、転写リプログラミングおよび生理的变化を引き起こし、病原体の増殖を効果的に阻害する (Bigeard, *et al.*, 2015)。

複数の LRR-RLK および LRR-RLP の共受容体として機能する SERK ファミリーはアオミドロ等の接合藻、および陸上植物に存在することから、陸上植物の出現前後に出現したことを示唆している (Hohman *et al.*, 2017)。同様に、SOBIR1 ファミリーは免疫関連の LRR-RLP に必要な共受容体であり、陸上植物に存在する (Liebrand *et al.*, 2013)。したがって、これら共受容体は、陸上植物の出現前後に進化した可能性が高い。一方で、RLCK, CDPK, MAPKKK, MAPKK, および MAPK のような細胞質キナーゼや、CNGC, OSCA, および NADPH オキシダーゼのような細胞膜局在下流シグナル成分は、すべての植物系統に見られるもので、その起源は古い。これらのタンパク質の藻類における機能は不明であるが、これらのタンパク質が陸上植物の出現前に免疫活性化において特化していた可能性がある。これに対し、TIR-NLR (Toll/Interleukin-1 Receptor - Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat) および LRR-RLP によって活性化される免疫に必要な EP タンパク質 (EDS1-PAD4 ホモログ) (Dongus and Parker, *et al.*, 2021)、およびヘルパー型 NLR (N Requirement Gene (NRG1), Activated Disease Resistance 1 (ADR1) ホモログ) (Feehan, *et al.*, 2020) は、裸子植物および被子植物 (種子植物) 에만存在する。LRR-RLP が古い起源のものであることを考えると、EP タンパク質およびヘルパー型 NLR が LRR-RLP シグナル伝達経路に統合され、種子植物において頑健性の高い免疫ネットワークを形成した可能性が高い (Lapin *et al.*, 2019)。

また、維管束植物における RLCK ファミリーのうち VII 型をコードする遺伝子群の数が拡大しているが、他のシグナル伝達成分ファミリーの拡大は PRR や NLR に比べて限定的であることから、PRR 遺伝子ファミリーの拡大は必ずしもその下流のコアとなる PTI シグナル伝達系の拡大を引き起こしていないといえる (Ngou *et al.*, 2024) . RLCK-VII 型は下流応答を活性化するために必要だが、どの RLCK-VII タンパク質であるかは、各 RLK および RLP によって異なる。さらに、病原体の分泌エフェクターは RLCK-VII 型を標的とし、免疫を抑制することが知られている (Zhang, *et al.*, 2010) . したがって、RLCK-VII サブグループ間の冗長性は、エフェクターの標的化に対する下流シグナル伝達経路の保護機構として機能している可能性が高い。また、植物は機能的な RLCK を保護するために、RLCK-VII 擬似キナーゼ、つまりは「デコイ」を進化させ、それを NLR が“ガード”している (DeYoung, *et al.*, 2012, Lewis *et al.*, 2013, Wang, *et al.*, 2015) . これらのデータを総合すると、RLCK-VII ファミリーの拡大は病原体からの圧力によっておこり、免疫シグナル伝達ネットワークの強靱化に寄与した可能性が高い。

3. 免疫および発生に関連する細胞表面受容体は共通起源を持つ

RLP の中では、LRR-RLP が最大のファミリーを構成するが、その中には PAMP や細胞間隙の存在するエフェクターを認識して免疫を活性化するのが知られている。LRR-RLP の細胞外ドメインは、LRR モチーフの間に挿入されたアイランドドメイン (Island Domain, ID) と呼ばれる領域を含み、C 末端の最後の 4 つの LRR モチーフの前に位置する (Ngou *et al.*, 2024) . このことから、LRR-RLP における ID の配置が機能的に必要であることを示唆している。特に LRR-RLK サブグループ Xb がこのドメインの配置をもち、LRR-RLP が同様の配置を共有していることが分かってきた。LRR-RLK-Xb のメンバーには、BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) ファミリーメンバー (Li and Chory, 1997) , PHYTOSULFOKIN RECEPTOR 1 (PSKR1) および PSY1 RECEPTOR (PSY1R) ファミリーメンバー (Matsubayashi, *et al.*, 2002) , EXCESS MICROSPOROCTES1 (EMS1) (Jia *et al.*, 2008) および NEMATODE-INDUCED LRR-RLK 1 (NLR1/GRACE) (Mendy *et al.*, 2017) が含まれる。興味深いことに、ID+4LRR モチーフを持つ LRR-RLP および LRR-RLK-Xb は、陸上植物に存在するが他の系統には存在しない。LRR-RLP と LRR-RLK-Xb の構造モチーフの類似性を考えると、これらの 2 つの受容体クラスが共通の起源を持つ可能性が高いと考えられる (Ngou *et al.*, 2024) . 実際に、LRR-RLK および LRR-RLP から最後の 4 つの LRR モチーフ (C3 領域と呼ばれる) を抽出し、系統樹を作ると、ID+4LRR を持つ LRR-RLP と LRR-RLK-Xb がクラスターを形成することは、これらの間に進化的関係性があることを示している。このクラスター (ID+4LRR クレード) 内には、BRI1/BRI1-LIKE (BRL) クレード、PSKR/PSY1R クレード、および主に LRR-RLP が含まれるサブクレードがあり、機能が保存されていると考えられる。BRI1 はブラシノステロイドを認識し、共受容体 BAK1 と相互作用して下流の応答を誘導する。同様に、PSKR1 はフィトスルフォカインを認識し、共受容体 SERK1/2 と相互作用する。一方で、LRR-RLP は PAMP やアポプラスティックエフェクターを認識し、共受容体 SERK ホモログである BAK1 および SOBIR1 と結合して免疫応答を開始する。構造研究により、BRI1, PSKR1, および LRR-RLP RXEG1 と SERK の相互作用メカニズムが明らかになっているが、BRI/BRL, PSKR/PSY1R, および

LRR-RLP クレードの最後の LRR モチーフ内に, SERK 相互作用に重要な保存されたモチーフ, グルタミン-x-x-スレオニン/セリン (QxxT/S) ループが存在していた (Santiago *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013, Ngou *et al.*, 2024) .

LRR-RLK-Xb はキナーゼドメインを通じて下流の応答を活性化する一方, LRR-RLP は SOBIR1 をリクルートして免疫を誘導する (Albert *et al.*, 2015) . LRR-RLP はキナーゼドメインを持たないため, 近接膜領域 (JM) および膜貫通領域 (TM) が免疫活性化に役割を果たすと考えられる. これまでに, SOBIR1 との結合に必要なグリシン-X-X-X-グリシン (GxxxG) モチーフの存在や, LRR-RLP の eJM 領域 (TM の前の JM 領域) における負に帯電したアミノ酸の役割が報告されている (Bi *et al.*, 2016) . LRR-RLP は eJM 領域の末端に強い負電荷を示し, 一方で LRR-RLK (SOBIR1 を含む) は eJM 領域の末端に正電荷を示す (Ngou *et al.*, 2024) . また, ほとんどの LRR-RLP は単一の GxxxG モチーフを持ち, 一部は二つ (GxxxGxxxG) または三つ (GxxxGxxxGxxxG) の連続したモチーフを持つが, 対照的に, LRR-RLK では GxxxG モチーフは比較的少ないが, SOBIR1, BAK1, および PSKR/PSY1R クレードに見られる (Ngou *et al.*, 2024) . BRII と RLP23 の TM 領域のキメラ実験から, RLP23 の TM 領域にある GxxxG モチーフが SOBIR1 との相互作用に必要であり, BAK1 との相互作用には必要でないことがわかった. また, RLP23 の eJM 領域が RLP23-BAK1 相互作用に必要であることが明らかになっている (Ngou *et al.*, 2024) .

5. 最後に

多くの PRR は系統特異的であり, 特定の被子植物の系統内, 例えばアブラナ科の EFR やナス科の Cf2/4/5/9 でのみ見られる LRR-RLK-XII や LRR-RLP が知られている (Jones *et al.*, 1994) . LRR-RLK, LRR-RLP, G-レクチン-RLK, WAK-RLK を含む PRR サブグループの拡大により, 異なる系統の植物は特定の病原体に特異的な分子をより広範囲に認識できるようになったと考えられる. SERK や SOBIR1 のような細胞表面共受容体は, 陸上植物の進化時またはその周辺で登場しており, FERONIA を含むマレクチン-RLK や BIR1, BIR2 を含む LRR-RLK-Xa のようなシグナル伝達調節に関与するいくつかの細胞表面受容体も, 陸上植物に特有である (Stegman *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2009) . PRR は下流のシグナル伝達成分 (RLCK-VII, CDPK, EP タンパク質など) を異なる方法で活性化し, 免疫応答の強度を調整している (Bredow *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2018) . RLCK-VII は陸上植物で拡大し, EP タンパク質と RPW8-NLR は維管束植物に特有である. このように, 陸上植物において複雑で特化した PTI シグナル伝達ネットワークは, 急速に進化する病原体に対する免疫応答の柔軟性と調節能を強化しているのだろう (Ngou *et al.*, 2022b) .

LRR-RLP と LRR-RLK-Xb の進化的関係性は, 免疫特異的な細胞表面受容体と発達特異的な細胞表面受容体の共通の起源を示唆している. これらの受容体の共通祖先の正確な性質 (RLK か RLP か) は不明であるが, LRR-RLK-Xb と ID+4LRR を持つ LRR-RLP は陸上植物に存在し, キナーゼドメインが陸上植物出現以前に存在していたことから, LRR-RLK-Xb が, LRR-RLP との統合により進化した可能性がある. このシナリオでは, 共通の祖先受容体は PAMP を認識し, その PAMP のペプチド配列が植物の発生プロセスを調節するフィトサイトカインとして機能していた可能性がある. 興味深いことに, PSK, PSY, SCOOP, CLE ペプチドのような複数のフィトサイトカインは, 植物病原体や害虫にも存在

する (Hou *et al.*, 2021b) . フィトサイトカインの認識が PAMP の認識から進化したのか, 病原体が免疫応答を抑制するためにフィトサイトカインの模倣物を発達させたのかは, 今後の研究で明らかにされることだろう.

謝辞

本研究は, 理化学研究所環境資源科学研究センター 植物免疫研究グループ諸氏の協力のもとに行われました. 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

- Albert, I. et al. An RLP23-SOBIR1-BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nat. Plants* 1, 15140 (2015).
- Bi, G. et al. SOBIR1 requires the GxxxG dimerization motif in its transmembrane domain to form constitutive complexes with receptor-like proteins. *Mol. Plant Pathol.* 17, 96–107 (2016).
- Boutrot, F. & Zipfel, C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55, 257–286 (2017).
- DeFalco, T. A. & Zipfel, C. Molecular mechanisms of early plant pattern-triggered immune signaling. *Mol. Cell* 81, 3449–3467 (2021).
- DeYoung, B. J., Qi, D., Kim, S.-H., Burke, T. P. & Innes, R. W. Activation of a plant nucleotide binding-leucine rich repeat disease resistance protein by a modified self protein. *Cell Microbiol.* 14, 1071–1084 (2012).
- Gao, M. et al. Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* 6, 34–44 (2009).
- He, Y., Zhou, J., Shan, L. & Meng, X. Plant cell surface receptor-mediated signaling - a common theme amid diversity. *J. Cell Sci.* 131, (2018).
- Hohmann, U., Lau, K. & Hothorn, M. The structural basis of ligand perception and signal activation by receptor kinases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68, 109–137 (2017).
- Hou, S., Liu, D. & He, P. Phytocytokines function as immunological modulators of plant immunity. *Stress Biol.* 1, 8 (2021a).
- Hou, S. et al. The Arabidopsis MIK2 receptor elicits immunity by sensing a conserved signature from phytocytokines and microbes. *Nat. Commun.* 12, 5494 (2021b).
- Jia, G., Liu, X., Owen, H. A. & Zhao, D. Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 2220–2225 (2008).
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. & Jones, J. D. G. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266, 789–793 (1994).
- Lapin, D. et al. A coevolved EDS1-SAG101-NRG1 module mediates cell death signaling by TIR-domain immune receptors. *Plant Cell* 31, 2430–2455 (2019).
- Lewis, J. D. et al. The Arabidopsis ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 18722–18727 (2013).
- Li, J. & Chory, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929–938 (1997).
- Liebrand, T. W. H. et al. Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 10010–10015 (2013).

- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Morita, A. & Sakagami, Y. An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science* 296, 1470–1472 (2002).
- Mendy, B. et al. Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase NILR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes. *PLoS Pathog.* 13, e1006284 (2017).
- Ngou, B. P. M., Ding, P. & Jones, J. D. G. Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *Plant Cell* 34, 1447–1478 (2022a).
- Ngou, B. P. M., Jones, J. D. G. & Ding, P. Plant immune networks. *Trends Plant Sci.* 27, 255–273 (2022b).
- Ngou, B.P.M., Wyler, M., Schmid, M. W., Kadota, Y., Shirasu, K. Evolutionary trajectory of pattern recognition receptors in plants. *Nature Comm.* 15: 308 (2024).
- Nürnberg, T. & Brunner, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 318–324 (2002).
- Rao, S. et al. Roles of Receptor-like cytoplasmic kinase VII members in pattern-triggered immune signaling. *Plant Physiol.* 177, 1679–1690 (2018).
- Santiago, J., Henzler, C. & Hothorn, M. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science* 341, 889–892 (2013).
- Stegmann, M. et al. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* 355, 287–289 (2017).
- Sun, Y. et al. Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell Res.* 23, 1326–1329 (2013).
- Wang, G. et al. The decoy substrate of a pathogen effector and a pseudokinase specify pathogen-induced modified-self recognition and immunity in plants. *Cell Host Microbe* 18, 285–295 (2015).
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D.G. and Doke, N. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15:706-718 (2003).
- Zhang, J. et al. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* 7, 290–301 (2010).
- Zipfel, C. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351 (2014).

コムギいもち病菌に対する抵抗性遺伝子の起源と進化

土佐 幸雄*†・足助聡一郎*

Tosa, Y.*† and Asuke, S.

Origin and evolution of genes for resistance to the wheat blast fungus

Abstract

Wheat blast caused by *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*) pathotype *Triticum* is now becoming a pandemic disease. *Rmg8* and *Rmg7*, genes for resistance to wheat blast found in common wheat and tetraploid wheat, respectively, recognize the same avirulence gene, *AVR-Rmg8*. We isolated these resistance genes and found that *Rmg7* was an allele of *Pm4*, a gene for resistance to wheat powdery mildew. On the other hand, *Rmg8* was its homoeolog ineffective against wheat powdery mildew. *Rmg8* variants with the ability to recognize *AVR-Rmg8* were distributed not only in *Triticum* spp. but also in *Aegilops* spp. This result suggests that the resistance gene(s) recognizing *AVR-Rmg8* originated before the differentiation of *Triticum* and *Aegilops*, that is, ~5 million years before the emergence of its current target, the wheat blast fungus. We also identified new resistance genes in *Ae. tauschii* and *T. dicoccum*, and designated them as *Rmg10* and *Rmg11*, respectively. To mitigate wheat blast, we began a breeding program for stacking these genes.

Key words: *Pyricularia oryzae*, *Magnaporthe oryzae*, wheat blast

*神戸大学大学院農学研究科 植物病理学研究室 Graduate School of Agricultural Science, Kobe University (†Corresponding author: tosayuki@kobe-u.ac.jp)

1. はじめに

新型コロナウイルスの世界的流行により、「パンデミック病」という用語は誰もが知る言葉となったが、この用語が適用されるのはヒト・動物の伝染病だけではない。今、植物病においてもパンデミック病になりつつある病害がある (Latorre et al., 2023)。コムギいもち病である (図 1)。本病は、1985 年、ブラジルで突如出現した (Urashima et al., 1993)。その後、1996 年にボリビア、2002 年にパラグアイ、2007 年にアルゼンチンと南米の周辺諸国に伝播し、南米におけるコムギの最重要病害の 1 つとなった (Singh et al., 2021; Valent et al., 2021)。しかし、ブラジルにおける初発後 30 年間は、その発生は南米諸国に限られており、南米の病気という認識であった。ところが、2016 年、コムギいもち病がバングラデシュで突如大発生した (Islam et al., 2016)。本



図 1. コムギいもち病の病徴.

病は瞬く間にバングラデシュ各地に広がり、同国のコムギ栽培に大打撃を与えた。これは、アジアおよびユーラシア大陸における初めてのコムギいもち病の outbreak であった。突然発生した本病に対し、バングラデシュの研究者・農民は有効な科学的対応策を持たず、とった対応は立毛中のいもち病発生コムギ畑に火を放って焼却することであった。さらに、2018 年には、アフリカ大陸のザンビアで、本病の outbreak が確認された (Tembo et al., 2020)。2023 年には、ブラジルの南西部隣接国で唯一未発生であったウルグアイにおいても、本病の発生が確認された。このように、本病は今、3 つの大陸に拡散し、その汚染地域を広げつつある。その拡散速度はヒトの病気のように急速ではないが、南米大陸の例を見れば、約 30 年かけてブラジルの南西部に隣接するすべての国に広がっている。翻ってアジアを見れば、バングラデシュ横には世界第 2 位のコムギ生産国であるインド、さらに北には世界第 1 位のコムギ生産国である中国がある。このままでは、ユーラシア大陸においてもバングラデシュを起点にこれらの周辺諸国に拡散し、本病が真のパンデミック病となって世界のコムギ生産に大打撃を与えることは容易に予想される。本病防除対策の構築、特に抵抗性品種の育成は急務である。

本病の病原菌は、イネいもち病菌と同種の *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*) である。*P. oryzae* は、イネを侵すイネ菌 (MoO)、アワを侵すアワ菌 (MoS)、シコクビエを侵すシコクビエ菌 (MoE)、ライグラスを侵すライグラス菌 (MoL) のように、いくつかの pathotype に分化しているが、これらの pathotype をコムギに接種しても発病しないし、逆にコムギから分離した菌をイネ・アワ・シコクビエ等に接種しても基本的に発病しない。すなわち、コムギいもち病菌は、これらとは異なる新規 pathotype であり、これが 1985 年に地球上に初めて出現したのである。この新菌群 *P. oryzae* pathotype *Triticum* (MoT) は、MoL またはその近縁菌が、非病原力遺伝子 *PWT3* の機能喪失によってホストジャンプすることにより進化したことが示唆されている (Inoue et al., 2017)。このような歴史的経緯を鑑みれば、現在のコムギ集団の中にコムギいもち病抵抗性遺伝子を見出すことは極めて難しいと予想される。1985 年以前には、コムギ集団は MoT に出会ったこともなく、従って

その選択圧にさらされたこともないと思われるからである。そのような中、我々はいくつかのコムギいもち病抵抗性遺伝子を見出し、そのクローニングを試みるとともに、それらを実用品種に導入するプロジェクトを進めてきた。本稿では、その概要を紹介する。

2. コムギいもち病抵抗性遺伝子の同定

表1は、2023年までにコムギにおいて同定されたいもち病抵抗性遺伝子の一覧である。主働遺伝子としては、*Rmg1*~*RmgGR119*の計10遺伝子が同定されているが、これらのうち5遺伝子(*Rmg1*, *Rmg4*, *Rmg5*, *Rmg6*, *Rmg9*)は、MoT以外の pathotype に対する抵抗性遺伝子、すなわち、属レベルの宿主範囲を決定する遺伝子であり、コムギの抵抗性育種には使えない。コムギいもち病菌 MoT に対する抵抗性遺伝子としては、*Rmg2*, *Rmg3*, *Rmg7*, *Rmg8*, *RmgGR119*の5遺伝子がある。なお、MoT に対して抵抗性を示す遺伝的ファクターとしては、コムギの近縁野生種 *Aegilops ventricosa* 由来の染色体断片 2NS が知られているが (Cruz et al., 2016), その上に座乗する抵抗性遺伝子はいまだ同定されていない。

表1. これまでに同定されたコムギのいもち病菌に対する抵抗性遺伝子

遺伝子/染色体断片	染色体	同定された品種等	対応する AVR遺伝子	ターゲット pathotype ^a	文献	同定者
<i>Rmg1</i> (<i>Rwt4</i>)	1D	Norin 4	PWT4	MoA	Takabayahi et al. 2002	神戸大
<i>Rmg2</i>	7A	Thatcher		MoT	Zhan et al. 2008	神戸大
<i>Rmg3</i>	6B	Thatcher		MoT	Zhan et al. 2008	神戸大
<i>Rmg4</i>	4A	Norin 4		MgD	Nga et al. 2009	神戸大
<i>Rmg5</i>	6D	Red Egyptian		MgD	Nga et al. 2009	神戸大
<i>Rmg6</i> (<i>Rwt3</i>)	1D	Norin 4, Chinese Spring	PWT3	MoL, MoA, MoE	Vy et al. 2014	神戸大
<i>Rmg7</i>	2A	<i>T. dicoccum</i> KU120	AVR- <i>Rmg8</i>	MoT	Tagle et al. 2015	神戸大
<i>Rmg8</i>	2B	S-615	AVR- <i>Rmg8</i>	MoT	Anh et al. 2015	神戸大
<i>Rmg9</i> (<i>Rwt6</i>)	1D	Norin 4, Chinese Spring	PWT6	MoE	Asuke et al. 2021	神戸大
<i>RmgGR119</i>		GR119		MoT	Wang et al. 2018	神戸大
2NS/2AS 転座染色体断片	2AS	<i>Ae. ventricosa</i>		MoT	Cruz et al. 2016	

^a MoA は *Avena* pathotype. MgD は別種 *Pyricularia grisea* (メヒシバ菌)

さて、表1を見てわかるように、これまでに報告されたコムギのいもち病抵抗性遺伝子は、すべて神戸大学で同定されたものである。その経緯を MoT に対する遺伝子に絞って概説しておきたい。上述のように、当初、現在のコムギ集団の中にコムギいもち病抵抗性遺伝子を見出すことは極めて難しいと予想していたが、探索を初めてみると意外に簡単に見つかった。筆者の1人土佐は、京都大学学生時代から前任の高知大学助手時代には、コムギうどんこ病研究に取り組んでいたが、その過程で様々なコムギ系統を入手・継代保存していた。それらを、ブラジル産コムギいもち病菌菌系 Br48 でスクリーニングしてみると、その結果、まず、高知大学時代に米国の Dr. Sears から入手していた普通系コムギ *Triticum aestivum* cv. Thatcher が Br48 に抵抗性を示すことに気が付いた。分離分析の結果、2つの抵抗性遺伝子を持つことが判明し、これらを *Rmg2*, *Rmg3* と命名した (Zhang et al., 2008)。つぎに、同じく高知大学時代に京都大学生殖質研究施設阪本寧男教授から分譲して頂き継代保存していた約50系統の二粒系コムギ系統を Br48 でスクリーニングしたところ、そのうちの3系統 (*T. dicoccum* St17, St24, St25) が強度の抵抗性を示すことを見出した。分離分析の結果、これらは同一の抵抗性遺伝子を 2A 染色体末端に保有することが判

明した。この遺伝子を *Rmg7* と命名した (Tagle et al., 2015)。さらに、学生時代に京都大学植物遺伝学研究室常脇恒一郎教授から分譲して頂いた普通系コムギ約 30 品種を Br48 でスクリーニングしたところ、そのうちの 1 品種 S-615 が強度の抵抗性を示すことを見出した。分離分析の結果、この品種は単一の抵抗性遺伝子を保有することが判明し、これを *Rmg8* と命名した (Anh et al., 2015)。興味深いことに、*Rmg8* は、2B 染色体末端の *Rmg7* とシニテニックな領域に座乗していた。さらに、*Rmg8* に対応する非病原力遺伝子 *AVR-Rmg8* をクローニングしたところ、これが *Rmg7* にも認識されることが判明した (Anh et al., 2018)。これらのことから、*Rmg7* と *Rmg8* は同祖遺伝子であると考えた。さらなる抵抗性遺伝子を求めて、世界中から収集した普通系コムギ在来約 520 系統を岡山大学加藤鎌司教授に分譲して頂き Br48 でスクリーニングしたところ、18 系統の抵抗性系統を見出した (Wang et al., 2018)。予想外の高頻度に不思議な思いがしたが、ともあれ 18 系統もあれば、これらの中には数個の新規抵抗性遺伝子は見つかるだろうと期待した。ところが、Br48ΔA8 (Br48 の *AVR-Rmg8* 破壊株) を接種したところ、これらのほとんど (17 系統) は感受性となった。このことは、これら 17 系統の抵抗性はすべて *Rmg8* (or *Rmg7*) によることを示している。残る 1 系統 (GR119) は、Br48ΔA8 に対して完全感受性にはならなかったが、抵抗性の程度の低下 (中度抵抗性) を示した。このことからこの系統も *Rmg8* (or *Rmg7*) を保有していることが示唆された。分離分析の結果、GR119 は *Rmg8* (or *Rmg7*) に加えてもう一つ、この中度抵抗性に関与する遺伝子を持つことが判明し、これを *RmgGR119* (仮称) と命名した。

3. *Rmg8*, *Rmg7* のクローニング

前項の結果をまとめると、やはり、現在のコムギ集団の中に新規コムギいもち病抵抗性遺伝子を見出すのはそれほど容易ではない。唯一 *Rmg8* (or *Rmg7*) が、ある程度の頻度で広がっているようである。上記の抵抗性 18 系統 (*Rmg8/Rmg7* carrier) の採集地を見ると、中東から欧州にかけての地域に偏在している。これらの系統は、1985 年にブラジルにおいてはじめて地球上に出現したコムギいもち病菌に出会ったことはないはずである。これらの遺伝子は何のために、どのようにして中東～欧州のコムギ集団中に維持されてきたのであろうか。

この間に対する答えを得るため、*Rmg8* のクローニングを試みた。マッピングならびに改変 *RaIDeN* 法 (Shimizu et al., 2022) により候補遺伝子を特定し、コムギの形質転換による証明に取り掛かっていた矢先、Sánchez-Martín (2021) という論文が発表された。コムギうどんこ病抵抗性遺伝子 *Pm4* のクローニングに成功したことを報告したものであったが、この遺伝子の塩基配列が我々の *Rmg8* 候補遺伝子のものとほぼ同じであった。正確に言えば、彼らが証明に用いたのは *Pm4* のアレルの 1 つ *Pm4b* で、それとともにその他のアレル *Pm4a*, *Pm4d* を持つうどんこ病抵抗性品種から PCR 増幅して *Pm4a*, *Pm4d* の配列を明らかにし、さらにうどんこ病感受性品種からも PCR 増幅して、*Pm4f*, *Pm4g* のようなうどんこ病菌に効かない新規「アレル」を見出していた。*Rmg8* は、この *Pm4f* と同一であった。さらに、*Rmg7* はうどんこ病に効く *Pm4a* と同一であった。*Pm4a*, *Pm4b*, *Pm4d* はメンデル遺伝学的に 2A 染色体長腕末端に座乗することが明らかとなっており、これは *Rmg7* が 2A 染色体長腕末端に座乗することと矛盾しない。一方、*Pm4f*, *Pm4g* については、Sánchez-Martín (2021) はアレル扱いしているものの座乗染色体は明らかにしておらず、*Rmg8* が 2B 染色体長腕末端に座乗していても不思議ではない。以上を総合し、*Rmg7* はコムギうどんこ病

抵抗性遺伝子 *Pm4a* そのもの、*Rmg8* はその同祖遺伝子であると結論した。第2節で述べた推論「*Rmg7* と *Rmg8* は同祖遺伝子である」が正しいことが証明されたのである。これらの遺伝子は、kinase fusion protein (Fahima and Coaker, 2023) をコードしていた (図2)。また、V1, V2 という2つのスプライシングバリエントを生成し、その両者が抵抗性の発現に必要であることが確認された。なお、以上の結果を論文化するための最終詰めに入っていた2023年春、John Innes Centre の旧知の研究者 Dr. Nicholson からの personal communication により、彼らが全く別の手法 (genome-wide association study, GWAS) を用いてほぼ同様の結論にたどり着いたことを知った。独立したラボが同じ結論に同時にたどり着いた例というのは、これまでも時々見聞きしていたが、その1例を自ら体験することとなった。我々の論文は Asume et al. (2024) として、彼らの論文は O'Hara et al. (2024) として、Nature Plants の同じ号に掲載された。両論文の結果を総合すると、これらの「*Pm4* アレル」はいもち病菌ならびにうどんこ病菌に対する反応により次の3つのグループに分けられる。(I) 両菌に効くもの: *Pm4a* (*Rmg7*), *Pm4b*, *Pm4d*. (II) いもち病菌のみに作用するもの: *Pm4f* (*Rmg8*). (III) いずれにも効かないもの: *Pm4g*. ここで重要なのは、うどんこ病菌のみに作用するものがないことである。換言すれば、いもち病菌に作用するものの中に、うどんこ病菌に作用するものが部分集合として含まれる。これが、後に述べる遺伝子の進化モデルを作出する際に、一つの手がかりとなってゆく。

上述の普通系コムギ在来520系統中に見出された抵抗性18系統に、新たに見出した抵抗性3系統を加え、計21系統から保有アレルを増幅し塩基配列を調べたところ、8系統は *Pm4a* を、1系統は *Pm4b* を保有していることが判明した。 *Pm4a* (= *Rmg7*) ならびに *Pm4b*

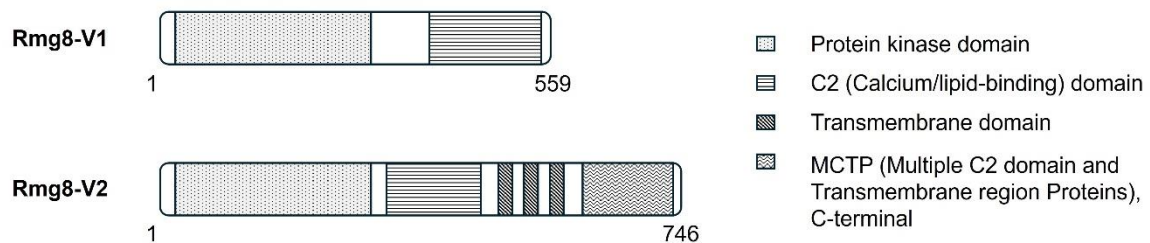


図2. *Rmg8* がコードするタンパク質。

は、いもち病菌のみならずうどんこ病菌にも作用する。したがって、これらのアレルはうどんこ病抵抗性という優位性のゆえに、中東～欧州の普通系コムギ集団中に維持されてきたと考えるのが自然である。一方、残りの12系統は、*Pm4f* (= *Rmg8*) のキャリアであったが、上述のように *Pm4f* はいもち病菌には効くもののうどんこ病菌には作用しないので、これらが集団中に維持されてきた理由をうどんこ病抵抗性で説明することはできない。そこで、これらの遺伝子の起源を遡及してみることにした。なお、これ以降、*Rmg7*, *Rmg8* を含む「*Pm4* アレル」ならびにそのホモログを「*Rmg8* バリエント」と総称することにする。

4. *Rmg8* バリエントの起源と進化

コムギ近縁野生植物である *Aegilops* 属植物の中に、*Rmg8* バリエントが存在するか否かを調べるため、*Aegilops* 属10種909系統にまず Br48 を接種したところ、7種67系統が抵抗性を示した。次にこれら抵抗性系統に Br48ΔA8 を接種したところ、驚いたことに3種35系統 (*Ae. umbellulata* 27系統, *Ae. comosa* 1系統, *Ae. speltoides* 7系統) が感受性を示した

(Asuke et al., 2024) . *Ae. umbellulata* に至っては, Br48 に抵抗性を示した系統自体が 27 系統で, そのすべてが Br48ΔA8 に感受性を示した. このことは, これら 3 種 35 系統が AVR-Rmg8 を認識すること, 換言すれば, 機能的 Rmg8 バリエントを保有していることを示唆している. 実際にこれら系統から Rmg8 増幅用プライマーで増幅を行ったところ, Rmg8 バリエントを得ることができた. *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa*, *Ae. speltoides* のバリエントをそれぞれ *AeuRmg8*, *AecRmg8*, *AesRmg8* とした. それらの塩基配列を元に系統樹を描いてみると, 興味深いことに, *AesRmg8* は Rmg7, Rmg8 と同じクラスターに属する一方, *AeuRmg8*, *AecRmg8* は, 別のクラスターを形成した. *AesRmg8* が見いだされた S ゲノムは, コムギの B ゲノムと極めて類似していることが知られている (Li et al., 2022; Miki et al., 2019) . すなわち, Rmg8 バリエントの近縁関係は, それぞれを保有するゲノムの近縁関係とよく一致する. このことから, それら Rmg8 バリエントは, *Triticum* 属と *Aegilops* 属の間を水平移動したわけではなく, ゲノム分化に伴って分化していったことが示唆された. 以上のことから, AVR-Rmg8 の認識能力をもつ Rmg8 バリエントの起源は, *Triticum* 属と *Aegilops* 属の分化前, すなわち 500 万年前 (Fu, 2021) 以前に遡ると考えた. そうすると, これらの Rmg8 バリエントは, 500 万年前からコムギいもち病菌が出現する 1985 年までの 500 万年の間, コムギいもち病菌による選択圧を受けることなく, AVR-Rmg8 認識機能を持ち続けていたことになる. 病原菌による選択圧なしに, そのようなことは可能なのだろうか. この謎を説明する 1 仮説として, 現在我々は, これらの遺伝子が他の病原菌に対する抵抗性遺伝子として重要な役割を果たしていたのではないかと考えている. そして, 上述の「普通系コムギ 12 系統に見出された *Pm4f* が, 中東~欧州の集団に維持されてきた理由」もこれで説明できるのではないかと考える. それらの 12 系統と *AeuRmg8* 保有 *Ae. umbellulata* 27 系統の地理的分布を調べると, 北緯 40 度あたりで重なり合うことは興味深い.

さて, *AeuRmg8* 保有系統にうどんこ病菌を接種したところ, このバリエントがうどんこ病菌には作用しないことが示唆された. どうやら, やはりうどんこ病菌認識より AVR-Rmg8 認識の方が先に成立したようである. この事実, 上述の「いもち病菌に作用するものの中に, うどんこ病菌に作用するものが部分集合として含まれる」という事象, ならびに塩基配列に基づいて作成した系統樹をもとに, 次のような進化過程のモデルを構築した (Asuke et al., 2024) .

- (i) 500 万年前以前に, AVR-Rmg8 認識能を持つ Rmg8 バリエントのプロトタイプが出現した. このプロトタイプはうどんこ病菌を認識する能力は持たなかった.
- (ii) やがて, このプロトタイプから *AeuRmg8*, *AecRmg8* の枝と *Pm4* アレルの枝が分岐した.
- (iii) *Pm4* アレルクラスターのなかに, *Pm4f*, *Pm4g* 等が出現した.
- (iv) *Pm4f* から, うどんこ病菌に効く *Pm4a*, *Pm4d*, さらに *Pm4b* が分化した.
- (v) 1985 年にコムギいもち病菌が出現することにより, *Pm4f* がコムギいもち病抵抗性遺伝子として, また *Pm4a*, *Pm4b*, *Pm4d* はコムギうどんこ病菌とコムギいもち病菌の両者に作用する遺伝子として, 我々に認識されることになった.

これは, 一つの遺伝子とその進化過程において, 新たなターゲットを獲得していく過程を描いた最初の例であると思われる.

5. コムギいもち病抵抗性品種の育成を目指して

コムギのように大面積で栽培される基幹作物においては、現実的な病害防除方法は抵抗性育種である。そこで、コムギいもち病抵抗性育種に着手した。コムギいもち病抵抗性遺伝子が現場で実際に役立つためには、まず第一に、穂で効く必要がある。これは、コムギいもち病が主として穂に出る病気だからである。ただし、最近葉の病斑も穂への接種源として重要視されるようになり、理想的には葉と穂の両方で効く遺伝子が望ましい。第二に、高温でも作用する必要がある。これは、コムギいもち病が高温で大発生する病気だからである。これまでにコムギいもち病が大発生して問題になった国・地域は、いずれも出穂～収穫期に高温になる地域である。ところが、コムギは冬作物であるがゆえに、多くの遺伝子は高温で作用する必要に迫られたことがなく、従って高温耐性を持たないようである。そのようななかで、高温（28～30℃）でも作用する遺伝子を探し出さなくてはならない。表2は、表1から MoT に作用する抵抗性遺伝子を抜き出したものである。*Rmg2*, *Rmg3* は、穂でも高温でも効かず、従って育種には使えない。*Rmg7*, *RmgGR119* は穂では効くものの、高温耐性はない。従ってやはり育種には使えない。（ただし、*Rmg7* と同じ塩基配列の *Pm4a* を持ちながら高温耐性を示すコムギ系統も見つかっており、高温耐性には遺伝的背景が重要なようである。）そうすると、これらの中で現場において使える遺伝子（因子）は、*Rmg8* と 2NS の2因子のみということになる。そこで、さらなる抵抗性遺伝子を求めて *Triticum - Aegilops* 属植物のスクリーニングを行った。その結果、*Ae. tauschii*（タルホコムギ）の1系統 KU-2097 に有望な遺伝子を同定することに成功し、これを *Rmg10* と命名した（Yoshioka et al., 2024）。さらに *T. dicoccum*（二粒系コムギ）の1系統 St19 に、きわめて高温に強い抵抗性遺伝子を見出し、これを *Rmg11* と命名した（Islam et al., 2024）。

表2. コムギいもち病抵抗性遺伝子の性質

遺伝子/ 染色体断片	ターゲット pathotype	有効性		
		幼苗	穂	高温
<i>Rmg2</i>	MoT	Yes	No	No
<i>Rmg3</i>	MoT	Yes	No	No
<i>Rmg7</i>	MoT	Yes	Yes	No
<i>Rmg8</i>	MoT	Yes	Yes	Yes
<i>RmgGR119</i>	MoT	Yes	Yes	No
2NS	MoT	No	Yes	Yes

Durable な抵抗性を実現するためには、これらを pyramiding する必要があるが、その際に一つ注意すべきことがある。各抵抗性遺伝子を単独で保有する系統を育成し個別に農家圃場に導入すると、それらを侵す新規病原性レースが速やかに出現することは過去のイネいもち病抵抗性育種の例からも容易に予測できる。一旦、そのようなレースが生成すれば、複数の抵抗性遺伝子を pyramiding した品種をその後リリースしても、いもち病菌にとってそれを乗り越えて病原化することはそれほど困難ではない。プラスアルファの突然変異、あるいはすでに変異した非病原力遺伝子の組み合わせにより複数遺伝子による抵抗性を乗り越えられるからである。したがって、抵抗性遺伝子の育種利用において重要なことは、戦場での戒めとして古来よく言われる如く「戦力の逐次投入」をしないことである。換言すると、上記遺伝子を農家圃場にリリースする場合、pyramiding を行った品種を最初から投入することが肝要である。コムギいもち病という新規病害に対する抵抗性遺伝子の農業現場へのリリースは、（遺伝子未同定の 2NS 染色体断片を除いて）今まさに我々により始まろうとしているところであり、この開始段階で戦略を間違ってはならない。現在、2NS, *Rmg8*, *Rmg10* の3遺伝子（ヘテロ）保有個体が 11 個体、2NS, *Rmg8*, *Rmg11* の3遺伝子（ヘテロ）保有個体が 10 系統得られている。当初、これらを4回戻し交雑して同質遺伝子系統にした後各国研究機関に配布する予定であったが、CIMMYT（国際トウモロコシ・コムギ改良センター）からそれらの固定系

統をできるだけ早く欲しいという要請があった。そこで、それぞれを 1 回戻し交雑後自殖して BC₁F₃ 世代で 3 遺伝子を固定し、それら固定系統を CIMMYT に送付することにした。それらの 3 遺伝子保有系統同士を交雑すれば、その F₂ のなかに、4 遺伝子保有系統が 1/16 の割合で出現するはずである。CIMMYT はそれらの遺伝子を世界各国の優良品種に導入し、配布する手筈となっている。

6. おわりに

コムギもち病がその分布域を着実に拡大している状況を冷静に見れば、MoT がまだ侵入していない国においても直ちに抵抗性育種を始める必要があることは自明かつ異論のないところである。抵抗性育種には時間がかかるので、侵入してから慌てて育種を始めても遅いからである。ところが、この「予防的育種」を推進しようとしても、二つの大きな壁がある。第一に、ファンドのサポートを得るのが極めて難しい。例えば、日本でコムギもち病抵抗性育種を目指したファンドを申請しても「この病気は日本では問題になっていませんね。」というシンプルな理由で却下されてしまう。幸い、数年前日本が G20 の議長国になったことを機に農水省で国際共同研究ファンドが立ち上がり、そのサポートを得て本研究を推進・完遂することができた。ヒトやモノが瞬時に諸国をまたいで動く今、病虫害の研究は、常に世界的視野で進めなければならないと強く思う。

第二に、育種を始めようとしても、現場の breeder にとっては現実的にはなかなかモチベーションが上がらない。MoT がまだ侵入していないのであるから、植物防疫上圃場における接種試験・抵抗性選抜ができない。従って強く優良な系統ができてゆく様子を圃場で確認することができない。さらに、もし MoT が将来的にも侵入してこなかったら、作出した抵抗性系統はお蔵入りになるだけである。しかし、我々の *Rmg8* のクローニングは、これらの問題を克服することを可能にした。*Rmg8* の本体がわかったわけであるから、接種試験をしなくても分子選抜により間違いなく *Rmg8* 保有系統を選抜できる。さらに、導入遺伝子としてももち病菌とうどんこ病菌の両者に効く遺伝子を選べば、圃場におけるうどんこ病接種試験により、強く優良な系統が出来上がっていく様子をトレースできる。うどんこ病抵抗性育種が将来的な MoT の侵入に対する備えになるのである。そして、将来的に MoT が侵入しなかったとしても、その系統はお蔵入りにすることなく、うどんこ病抵抗性系統として生きる。

外国では、病害抵抗性育種は大きな研究分野を形成している。一方、日本ではこれに携わる研究者が、植物病理学会においても育種学会においても少ないように思う。今後、両学会において Host-Parasite Interaction の遺伝学・病害抵抗性の育種に取り組む研究者が増え、協力しながらこの分野をより立てていくことを期待する。

謝辞

本研究を共に遂行した Asuke et al. (2024) の共著者諸氏ならびに神戸大学大学院農学研究科植物病理学研究室ポスドク・学生諸氏に心より感謝の意を表する。また、貴重なコムギ・エギロプス属植物系統を御分譲頂いた京都大学名誉教授故常脇恒一郎博士、同名誉教授阪本寧男博士、岡山大学特任教授加藤鎌司博士、NBRP コムギスタッフ諸氏に厚く御礼申し上げる。なお、本研究は、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」(01001A), 農林水産技術会議 G20 プロジェクト「地球規模の課題解決に向けた国際共同研究の推進」の支援を受けて行った。

引用文献

- Anh, V. L., Anh, N. T., Tagle, A. G., Vy, T. T. P., Inoue, Y., Takumi, S., Chuma, I. and Tosa, Y. (2015) *Rmg8*, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in hexaploid wheat. *Phytopathology* 105:1568-1572.
- Anh, V. L., Inoue, Y., Asuke, S., Vy, T. T. P., Anh, N. T., Wang, S., Chuma, I. and Tosa, Y. (2018) *Rmg8* and *Rmg7*, wheat genes for resistance to the wheat blast fungus, recognize the same avirulence gene *AVR-Rmg8*. *Mol. Plant Pathol.* 19:1252-1256.
- Asuke, S., Morita, K., Shimizu, M., Abe, F., Terauchi, R., Nago, C., Takahashi, Y., Shibata, M., Yoshioika, M., Iwakawa, M., Kishi-Kaboshi, M., Su, Z., Nasuda, S., Handa, H., Fujita, M., Tougou, M., Hatta, K., Mori, N., Matsuoka, Y., Kato, K. and Tosa, Y. (2024) Evolution of wheat blast resistance gene *Rmg8* accompanied by differentiation of variants recognizing the powdery mildew fungus. *Nat. Plants* 10:971-983.
- Cruz, C. D., Peterson, G. L., Bockus, W. W., Kankanala, P., Dubcovsky, J., Jordan, K. W., Akhunov, E., Chumley, F., Baldelomar, F. D., and Valent, B. (2016) The 2NS translocation from *Aegilops ventricosa* confers resistance to the *Triticum* pathotype of *Magnaporthe oryzae*. *Crop Sci.* 56:990–1000.
- Fahima, T. and Coaker, G. (2023) Pathogen perception and deception in plant immunity by kinase fusion proteins. *Nat. Genet.* 55:908-909.
- Fu, Y.-B. (2021) Characterizing chloroplast genomes and inferring maternal divergence of the *Triticum-Aegilops* complex. *Sci. Rep.* 11:15363.
- Inoue, Y., Vy, T. T. P., Yoshida, K., Asano, H., Mitsuoka, C., Asuke, S., Anh, V. L., Cumagun, C. J. R., Chuma, I., Terauchi, R., Kato, K., Mitchell, T., Valent, B., Farman, M. and Tosa, Y. (2017) Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. *Science* 357:80–83.
- Islam, M. T., Croll, D., Gladieux, P., Soanes, D. M., Persoons, A., Bhattacharjee, P., Hossain, M. S., Gupta, D. R., Rahman, M. M., Mahboob, M. G., Cook, N., Salam, M. U., Surovy, M. Z., Sancho, V. B., Maciel, J. L. N., Nhani Júnior, A., Castroagudín, V. L., Reges, J. T. d. A., Ceresini, P. C., Ravel, S., Kellner, R., Fournier, E., Tharreau, D., Lebrun, M.-H., McDonald, B. A. Stitt, T., Swan, D., Talbot, N. J., Saunders, D. G.O., Win, J. and Kamoun, S. (2016) Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Biol.* 14:1–11.
- Islam, T. M., Nago, C., Yoshioka, M., Vy, T. T. P., Tosa, Y. and Asuke, S. (2024) Identification of *Rmg11* in tetraploid wheat as a new blast resistance gene with tolerance to high temperature. *Phytopathology* (in press).
- Latorre, S. M., Were, V. M., Foster, A. J., Langner, T., Malmgren, A., Harant, A., Asuke, S., Reyes-Avila, S., Gupta, D. R., Jensen, C., Ma, W., Mahmud, N. U., Meheub, M. S., Mulenga, R. M., Muzahid, A. N. M., Paul, S. K., Rabby, S. M. F., Rahat, A. A. M., Ryder, L., Shrestha, R.-K., Sichilima, S., Soanes, D. M., Singh, P. K., Bentley, A. R., Saunders, D. G. O., Tosa, Y., Croll, D., Lamour, K. H., Islam, T., Tembo, B., Win, J., Talbot, N. J., Burbano, H. A. and Kamoun, S. (2023) Genomic surveillance uncovers a pandemic clonal lineage of the wheat blast fungus. *PLoS Biol.* 21:e3002052.
- Li, L. -F., Zhang, Z. -B., Wang, Z. -H., Li, N., Sha, Y. Wang, X. -F., Ding, N., Li, Y., Zhao, J. Wu, Y., Gong, L., Mafessoni, F., Levy, A. A. and Liu, B. (2022) Genome sequences of five *Sitopsis* species of *Aegilops* and the origin of polyploid wheat B subgenome. *Mol. Plant* 15:488-503.

- Miki, Y., Yoshida, K., Mizuno, N., Nasuda, S., Sato, K. and Takumi, S. (2019) Origin of wheat B-genome chromosomes inferred from RNA sequencing analysis of leaf transcripts from section Sitopsis species of *Aegilops*. *DNA Res.* 26:171-182.
- O'Hara, T., Steed, A., Goddard, R., Gaurav, K., Arora, S., Quiroz-Chávez, J., Ramírez-González, R., Badgami, R., Gilbert, D., Sánchez-Martín, J., Wingen, L., Feng, C., Jiang, M., Cheng, S., Dreisigacker, S., Keller, B., Wulff, B. B. H., Uauy, C. and Nicholson, P. (2024) The wheat powdery mildew resistance gene *Pm4* also confers resistance to wheat blast. *Nat. Plants* 10:984-993.
- Sánchez-Martín, J., Widrig, V., Herren, G., Wicker, T., Zbinden, H., Gronnier, J., Spörri, L., Praz, C. R., Heuberger, M., Kolodziej, M. C., Isaksson, J., Steuernagel, B., Karafiátová, M., Doležel, J., Zipfel, C. and Keller, B. (2021) Wheat *Pm4* resistance to powdery mildew is controlled by alternative splice variants encoding chimeric proteins. *Nat. Plants* 7:327-341.
- 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.* 119:e2116896119.
- Singh, P. K., Gahtyari, N. C., Roy, C., Roy, K. K., He, X., Tembo, B., Xu, K., Juliana, P., Sonder, K., Kabir, M. R. and Chawade, A. (2021) Wheat Blast: A disease spreading by intercontinental jumps and its management strategies. *Front. Plant Sci.* 12:710707.
- Tagle, A. G., Chuma, I. and Tosa, Y. (2015) *Rmg7*, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* identified in tetraploid wheat. *Phytopathology* 105:495-499.
- Tembo, B., Mulenga, R. M., Sichilima, S., M'siska, K. K., Mwale, M., Chikoti, P. C., Singh, P. K., He, X., Pedley, K. F., Peterson, G. L., Singh, R. P. and Braun, H. J. (2020) Detection and characterization of fungus (*Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum*) causing wheat blast disease on rain-fed grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Zambia. *PLoS ONE* 15: e0238724.
- Urashima, A. S., Igarashi, S. and Kato, H. (1993) Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant Dis.* 77:1211-1216.
- Valent, B., Cruppe, G., Stack, J. P., Cruz, C. D., Farman, M. L., Paul, P. A., Peterson, G. L. and Pedley, K. F. (2021) Recovery plan for wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* pathotype *Triticum*. *Plant Heal. Prog.* 22:182-212.
- Wang, S., Asuke, S., Vy, T. T. P., Inoue, Y., Chuma, I., Win, J., Kato, K., and Tosa, Y. (2018) A new resistance gene in combination with *Rmg8* confers strong resistance against *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in a common wheat landrace. *Phytopathology* 108:1299-1306.
- Yoshioka, M., Kishii, M., Singh, P. K., Inoue, Y., Vy, T. T. P., Tosa, Y. and Asuke, S. (2024) *Rmg10*, a novel wheat blast resistance gene derived from *Aegilops tauschii*. *Phytopathology* (in press).
- Zhan, S. W., Mayama, S., and Tosa, Y. 2008. Identification of two genes for resistance to *Triticum* isolates of *Magnaporthe oryzae* in wheat. *Genome* 51:216-221.

植物感染生理談話会論文集（第 58 号）

原稿受理 令和 6 年 7 月 2 9 日
印 刷 令和 6 年 8 月 1 9 日
発 行 令和 6 年 8 月 2 8 日

発行者 日本植物病理学会
会 長 一瀬 勇規
〒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 6 年度植物感染生理談話会事務局
吉岡博文・竹本大吾・千葉壮太郎・佐藤育男
〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町
名古屋大学大学院 生命農学研究科
印 刷 名古屋大学消費生活協同組合 印刷部
〒464-0814 愛知県名古屋市千種区不老町 1
