

# 研究終了報告書

## 「糖吸収競合を介して形成される植物-病原体間相互作用の分子基盤の解明」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：山田 晃嗣

### 1. 研究のねらい

独立栄養生物である植物は、光合成により空気中の二酸化炭素から糖を合成し炭素を得ることができる一方で、従属栄養生物は他の生物から有機化合物を摂取することでしか炭素を獲得できない。そのため従属栄養生物である植物病原体は、感染時に炭素源として糖を植物から摂取している。しかしその一方で、宿主が病原体の栄養吸収に対する防御策を備えているかは不明であった。本研究では近年、植物が糖トランスポーター制御を介して細胞外の糖を回収し、病原体の糖摂取を阻害する機構を持つことを見出した。そして本結果より、植物-病原体間相互作用の形成には糖吸収が重要な要素であることが明らかとなった。そこで本さがけ研究では、課題1として、さらなる防御応答活性化時の糖トランスポーター制御および細胞内へ吸収された糖の免疫応答への寄与を解析する。そして課題2としては、病原体の糖吸収機構の分子メカニズムの解析を実施する。植物に感染する病原体側も様々な生活様式に適応した多様な糖吸収メカニズムを備えているが、その分子メカニズムの解析例は乏しい。課題2では、作物に炭疽病を引き起こす *Colletotrichum* 属の病原糸状菌を対象に、感染プロセスに重要な糖トランスポーターを同定することにより糖吸収戦略の分子機構を明らかにする。

以上の2つの課題から、本さがけ研究では糖吸収を基軸として植物-病原体間相互作用が形成される分子メカニズムの全体像を明らかにする。そして本研究により得られた知見を利用し、将来的には病原体の糖吸収を阻害する新規防除法の開発へ向けた展開を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

病原細菌は気孔や傷口から葉の内部に侵入後に細胞間隙中で増殖を行うため、細胞外の糖蓄積量のコントロールは病原細菌の増殖を抑制するために重要である。植物の細胞膜を介した糖輸送は糖トランスポーターの SWEET および STP によって制御されている。SWEET によりスクロースが排出され、細胞外でグルコースおよびフルクトースに加水分解された後に、STP を介して細胞内に吸収される。そこで本さがけ研究では課題1として、吸収および排出型の糖トランスポーターとして STP と SWEET に着目し、植物免疫への寄与とその活性制御を探った。まず、スクロースを輸送する SWEET11 および SWEET12 に着目し、二重変異体は細菌抵抗性が増加することを見出し、細胞外への糖輸送の減少が細菌の増殖抑制に繋がることが示された。次に SWEET11 および SWEET12 の活性制御を調べるために、相互作用因子を探索し、同定したプロテインキナーゼにより SWEET11 がリン酸化されることを突き止めた。しかし、リン酸化による輸送活性への影響は現在のところ検出できておらず、今後の解析が必要である。また、吸収型の糖トランスポーターとして、これまでに細菌抵抗性に寄与することを報告している STP1 および STP13 以外に、免疫応答時に発現が上昇する STP4 に着目して解析を行った。CRISPR/Cas9 により *stp4* 遺伝子破壊株を作製し解析

を行った結果、STP4 においても細菌抵抗性に寄与していることが明らかとなった。さらに *stp1 stp4 stp13* 三重変異体は免疫マーカー遺伝子の発現が顕著に低下していることを見出した。これまでは、糖トランスポーターの働きとして、病原体の糖吸収の阻害が主なものだと考えられてきたが、細胞内に吸収された糖は免疫応答の増強に寄与することが本結果より示された。また、課題2として病原系状菌・ウリ類炭疽病菌の感染プロセスと糖吸収の関連性を調べるために、病原性の発現に重要な糖トランスポーターの同定を試みた。ウリ類炭疽病菌を用いて迅速な遺伝子破壊解析を行うために、CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子破壊効率を向上させ、さらに Cre/loxP システムを用いることで多重遺伝子破壊株の作製を可能にした。現在、これらのシステムを用いて病原性に関与する糖トランスポーターの同定に向けて多重遺伝子破壊株の作製を鋭意進めている。

## (2) 詳細

### 課題1 防御戦略としての植物の糖トランスポーター制御

病原細菌は葉の内部に侵入後に細胞間隙中で増殖を行うため、細胞外の糖蓄積のコントロールが病原細菌の増殖の抑制には重要である。本研究者は免疫活性化時に吸収型の糖トランスポーターSTP13 がリン酸化により制御されることを見出し、以前に報告している (Yamada et al., *Science*, 2016)。そこで課題1では、まず初めに排出型の糖トランスポーターである SWEET においても免疫応答時に活性制御を受けるかを解析した。スクロースを排出する SWEET11 および SWEET12 の二重遺伝子破壊株は病原細菌に対して抵抗性が増加したことより、細胞外への糖の排出を低下させることで病原細菌の増殖を抑えることができることが示された。次に SWEET11 および SWEET12 が活性制御を受けるかを調べた。特に STP13 と同様にリン酸化修飾を受けていると推定し、リン酸化酵素との相互作用を共免疫沈降により調べた。そして SWEET11 および SWEET12 と相互作用するプロテインキナーゼを同定し、*in vitro* リン酸化解析により SWEET11 がリン酸化修飾を受けていることを見出した。しかし、同定したリン酸化部位を疑似アミノ酸残基に置換した SWEET11 の輸送活性を哺乳類の培養細胞を用いて測定したところ、輸送活性の変化は見られなかった。植物細胞内におけるリン酸化を介した制御タンパク質との相互作用の促進などにより SWEET11 の輸送活性の制御が行われている可能性も考えられるため、今後はリン酸化部位を非リン酸化残基に置換した SWEET11 を植物に導入し、リン酸化の細菌抵抗性への寄与を解析する予定としている。

次に、吸収型の糖トランスポーターSTP のなかでも免疫応答時の発現上昇が見られる STP4 に着目し、CRISPR/Cas9 システムを用いて *stp4* 破壊株を作製した。これまでに *stp1 stp13* (以下 *stp1/13*) 二重変異体は細菌抵抗性が低下していることを報告しているが、*stp1 stp4 stp13* (以下 *stp1/4/13*) 三重変異体は *stp1/13* 変異体よりも顕著に細菌抵抗性が弱まったことから STP4 においても細菌抵抗性に寄与していることが示された。さらに細菌のべん毛タンパク質由来の *flg22* ペプチドを処理することで防御応答を活性化させた際の遺伝子発現を RNA シークエンス解析により網羅的に調べた結果、*stp1/4/13* 変異体における免疫マーカー遺伝子の顕著な発現減少が検出された。糖トランスポーターが欠損すると細胞外に糖が蓄積するため、病原細菌の糖摂取が阻害できず感染が増大すると考えていたが、本

結果により糖吸収が植物の防御応答の活性化に直接関与することが示唆された。

そのため、次に糖と免疫応答の関連性を探る解析を行った。糖はエネルギー源以外に、シグナル分子として働くことが知られている。糖シグナルの研究では、糖を処理した際のシグナルの活性化が「糖の認識」と「代謝によるエネルギー供給」によるものかを区別するために、人工修飾グルコースの 2-デオキシグルコース (2DG) が用いられている。2DG は細胞内でヘキソキナーゼにより 2DG6 リン酸に変換されるが、その後の解糖系による代謝を受けないためエネルギーは産生されず、2DG 誘導性の遺伝子発現変動は「糖の認識」を介したものと考えられている。そこで、2DG を処理した際の遺伝子発現解析を RNA シークエンス解析により行った結果、多くの免疫マーカー遺伝子の発現が上昇していることを見出した。さらに、2DG 処理では免疫応答に関与する植物ホルモンであるサリチル酸の合成酵素の遺伝子発現が上昇しており、実際にサリチル酸の蓄積も検出された。本結果より、糖シグナルと免疫応答のクロストークの存在が明らかになった。さらに、*stp1/4/13* 変異体における *flg22* 処理時に発現が減少した遺伝子の多くは、2DG 誘導性を示しており、*stp1/4/13* 変異体では糖シグナルが低下した結果、免疫マーカー遺伝子の発現低下に繋がったと考えられた。そして次に、糖シグナル/免疫応答クロストークの分子機構を解明のため、2DG 誘導性の免疫マーカー遺伝子の発現を指標に変異体スクリーニングを行い、2DG 誘導性が増加または低下した変異体を単離した。

また、2DG は人工的な修飾グルコースだが、天然の糖にも免疫応答を活性化させる糖がないかをサリチル酸の蓄積を指標に探索を行った。その結果、2DG と同様に免疫応答を強く活性化させる糖も見出した。

以上の結果より、吸収型の糖トランスポーター STP の転写および輸送活性の増強により糖吸収が増加した結果、糖シグナルが活性化し、免疫応答の増強に繋がることが推測された。

## 課題2、感染戦略としての病原体の糖トランスポーターの役割

*Colletotrichum* 属の糸状菌は、植物に侵入後に生細胞から栄養を摂取する活物寄生ステージを経て、細胞を殺しながら増殖する殺生ステージに移行する。本課題では、この非常に複雑な *Colletotrichum* 属の糸状菌の感染プロセスにおける糖吸収の重要性を明らかにすることを目的とした。本課題では形質転換法が確立されており、感染時の遺伝子発現解析も報告されているウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) を用いて、糖トランスポーター遺伝子の網羅的な遺伝子破壊解析を実施し、病原性に関与する糖トランスポーター遺伝子の単離を試みた。ウリ類炭疽病菌の糖トランスポーター遺伝子の数は 100 以上あり、重複遺伝子による機能重複性も予測された。そこで本解析には、高効率の遺伝子破壊法および多重遺伝子破壊株の作製法の確立が必要であった。

まず初めに、ゲノム編集ツールの CRISPR/Cas9 システムを用いて標的遺伝子座に二重鎖切断を誘導したところ、相同組み換えによる遺伝子破壊効率が劇的に上昇することを見出した。また、遺伝子破壊の際に用いる選択マーカー (抗生物質耐性遺伝子など) には限りがあるため、より数多くの遺伝子を破壊するために、Cre/loxP システムをウリ類炭疽病菌用に最適化し、導入した選択マーカーをゲノムから除き再利用を可能にする方法を確立した。

これらのシステムを用いることによって、従来法に比べ、ウリ類炭疽病菌の多重遺伝子破壊株の作製を格段に容易にした。

糖トランスポーターの遺伝子破壊株の作製では、既報のウリ類炭疽病菌の感染時の遺伝子発現解析をもとに、感染時の誘導性が高い遺伝子を優先的に破壊し、遺伝子破壊株をキュウリに接種し病原性を調べた。現在までに、17 重遺伝子破壊株の作製を行ったが、病原性が低下した遺伝子破壊株は得られていない。今後も引き続き破壊株の作製を行い、病原性に関与する糖トランスポーターの同定を行う予定としている。

### 3. 今後の展開

本さがけ研究において、植物の免疫応答に糖トランスポーターが果たす働きとして、細胞内の糖シグナルの活性化があることを見出した。今後はこの分子機構を明らかにする解析を行う。まず、2DG 応答性が変化した変異体を単離していることから、変異体の原因遺伝子の同定を行い、2DG 応答性に関与する因子を明らかにすることで免疫応答/糖シグナルクロストークの分子メカニズムを明らかにする。また、2DG と同様に免疫応答を活性化させる天然の糖も見出している。病原体の防除は殺菌剤が主流であるが、プラントアクティベーターと呼ばれる植物の免疫応答を人工的に活性化させる薬剤も活用されている。そこで今後の展開として、糖のプラントアクティベーターとして利用法を検討していく。

またウリ類炭疽病菌の多重遺伝子破壊株を CRISPR/Cas9 システムや Cre/loxP システムを用いて簡便かつ迅速に作製する方法を確立した。今後は病原性に関与する糖トランスポーターの同定を進めていくとともに、糖シグナル因子の破壊株も作製し、病原体においても吸収後の糖がシグナル分子として働くかの解析を進める予定としている。

### 4. 自己評価

研究目的の達成状況については、本研究は植物と病原体の糖吸収競合のメカニズムを解析することを目的に、主に細胞膜での糖輸送を担う糖トランスポーターを解析対象としてスタートした。その結果、糖トランスポーターの相互作用因子や翻訳後修飾を見出すことができたが、免疫応答への意義を明らかにするまで解析を進めることができなかった。しかし一方で、植物-病原体相互作用の形成における植物側の糖トランスポーターの役割として、病原体の糖摂取を阻害するだけでなく、細胞内に糖を吸収することで自身の免疫応答を増強させる働きがあることを見出したことにより、植物-病原体相互作用の形成における糖の概念を拡大することができたと考えている。糖シグナル/免疫応答のクロストークに着目して変異体も単離しており、まだ原因遺伝子の同定まで至っていないが、今後も解析を進め分子メカニズムを明らかにしたい。しかし、研究が当初の狙いからは多少ずれてしまったため、研究を論文として報告するまでに至っていないことは反省すべき点である。また課題2として、ウリ類炭疽病菌の病原性に関与する糖トランスポーターを同定するために遺伝子破壊解析を実施していたが、当初の予想よりもウリ類炭疽病菌の糖トランスポーターの機能重複性が強いことが判明したため、多重遺伝子破壊株を作製するために Cre/loxP システムをウリ類炭疽病菌に適用するように最適化を行うことに時間がかかり、糖トランスポーターの同定まで至らなかった。しかし、本課題によりこれまでウリ類炭疽病菌の解析時に困難であった多重遺伝子破壊株の作製を容易にした点は今後の研究を進める上でも重要な成果であった。



研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)については、本研究はさきがけ研究者の山田と研究補助員1名の体制で行った。また本研究を進めるために学内における研究スペースの確保や分子生物学的な研究を進めるためのサーマルサイクラーや遠心機などの購入を行った。さらに糖やサリチル酸の測定のためにガスクロマトグラフ質量分析装置の購入も行い、効果的に研究を進めることができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果として、本研究では糖シグナルの活性化により免疫応答を増強させることを見出したことより、免疫応答を活性化して病原体の増殖を抑えるプラントアクティベーターとして糖を用いる可能性を示すことができた。2DGは人工的な修飾グルコースであるが、天然の糖の中からもサリチル酸を誘導することができるものを見出している。見出された糖はヒトへの害も少ないものであり、今後は糖散布による病原体の防除効果を探ることで、他の生物への影響が低くかつ安価な農薬の開発に繋がっていくことも期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のもも含む)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Kohji Yamadai, Yuriko Osakabe. Sugar compartmentation as an environmental stress adaptation strategy in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, No.16, 30399-8, 2017.
2. 山田晃嗣、糖輸送体の活性制御による植物の新規防御機構の解明、バイオサイエンスとインダストリー Vol76, No.2, 156-157, 2018年
3. 山田晃嗣、糖を巡る植物-病原菌間の攻防の分子メカニズムを探る、植物・微生物相互作用ワークショップ、2018年11月、岡山(招待講演)
4. 山田晃嗣、刑部敬史、高野義孝、CRISPR/Cas9とCre/loxPシステムを用いたウリ類炭疽病菌の効率的な多重遺伝子破壊株作製法の確立、平成31年度日本植物病理学会、2019年3月、茨城
5. Kohji Yamada, Yoshitaka Takano. Sugar transporters contribute to defense activation in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions congress*, 2019年7月、英国