

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07839

研究課題名(和文)糸状菌エンドファイトの共生確立における分泌タンパク質の機能

研究課題名(英文) Functions of secreted proteins to establish a symbiotic association with its host plant in fungal endophyte

研究代表者

竹本 愛子(田中愛子)(Takemoto, Aiko)

名古屋大学・生命農学研究科・学振特別研究員(RPD)

研究者番号：90464148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Epichloe festucaeにおける共生確立に不可欠な転写制御因子ProAが直接発現制御する遺伝子群を明らかにするため、SELEX法を用いてターゲットプロモーター配列を特定した。E. festucaeの染色体DNAライブラリーからMBPタグとProAとの融合タンパク質を用いてターゲットプロモーター配列を含むと推定されるDNAを濃縮した。Mi-seqを用いて解析した濃縮DNA配列をリファレンスゲノムにマッピングしターゲットプロモーター配列を特定した。遺伝子破壊による機能解析によって新たな4遺伝子がProAの下流で機能する共生関連遺伝子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：ProA is a transcription factor necessary for maintaining a symbiotic relationship with the host grass plants in Epichloe festucae. To identify ProA-binding sequences across the genome, we used a gSELEX method and collected the genomic DNA pools after gSELEX selection. The genomic DNA pools were sequenced using a Miseq platform. The direct target sequences were identified by mapping the reads to a reference sequence. Functional analysis of the potential new targets for ProA revealed 4 genes are encoding the proteins that contribute to maintaining the proper symbiotic interaction between E. festucae and the host ryegrass plants.

研究分野：農学

キーワード：共生

1. 研究開始当初の背景

植物内在性の共生微生物はエンドファイトと呼ばれている。*Epichloë* 属エンドファイト

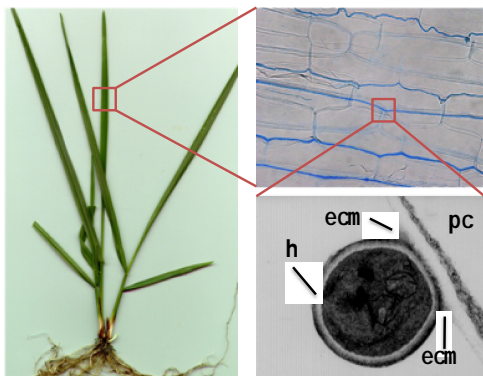


図1. *Epichloë* 属エンドファイトの感染
h エンドファイト菌糸、pc 植物細胞、
ecm 細胞外マトリックス(分泌物)

トは、イネ科牧草/芝草の細胞間隙で伸長し、共生関係を保っている糸状菌エンドファイトである(図1)。 *Epichloë* 属エンドファイトとイネ科牧草の関係においては、植物の顕著な防御応答は認められない。また、エンドファイトは自らの生育を適量に保つことで宿主植物にストレスを与えない持続的な感染を成立させており、エンドファイトは独特の宿主植物感染機構を保持していると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに宿主植物との共生関係維持に不可欠な糸状菌エンドファイトの遺伝子 *ProA* を同定している。転写制御因子をコードする *ProA* を欠失させると、エンドファイトの共生的感染能が失われ、異常な菌糸の増殖とともに

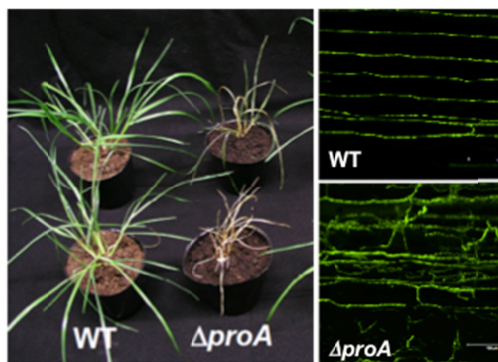


図2. *proA* 変異株感染による植物の枯死と
宿主内の菌糸の異常な生育

に宿主植物は枯死する(図2)。このことから、共生関係成立時の共生菌と宿主植物の細

胞間には何らかのシグナルのやり取りがある可能性が考えられた。さらに、野生株と *proA* 変異株の遺伝子発現プロファイルの比較により、ProA タンパク質に制御される下流遺伝子群に多数の分泌タンパク質が含まれていることを見出した。本研究では、分泌タンパク質を中心に ProA に直接転写制御を受け共生確立に重要な役割を担っている遺伝子群を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ProA に直接発現制御を受ける下流遺伝子群の同定

ProA タンパク質が直接結合するプロモーター配列を特定するため、SELEX 法を用いプロモーター配列の回収を行った。SELEX 法に必要なゲノムライブラリーを作成し、ProA タンパク質とタグとなる MBP との融合タンパク質を用いて、ProA 結合性プロモーター配列を回収した。先に同定している ProA 結合プロモーター配列 *PesdC b5* を定量 PCR により検出し、濃縮前の DNA と比較した。得られた濃縮 DNA について Miseq を用いて配列解析 (SELEX-seq) を行った。

ProA に発現誘導を受ける共生時特異的タンパク質群の局在部位の特定

SELEX-seq 解析によって見いだされた ProA に制御される共生時特異的分泌タンパク質について、GFP との融合タンパク質を恒常的に発現する形質転換体を作出した。得られた形質転換体における培養時の GFP 蛍光の局在を観察した。

共生時特異的タンパク質群の共生確立過程における機能解析

破壊株を作出し、ペレニアルライグラスに対する感染能を検定した。接種植物の葉鞘を菌糸染色液(アニリンブルー)で染色し、菌糸の有無、菌糸が確認された場合はその伸長パターンおよび菌糸量を野生株と比較した。

4. 研究成果

ProA に直接発現制御を受ける下流遺伝子群の同定

SELEX 法を用いて回収した DNA について

Miseq を用いて配列解析 (SELEX-seq) を行った。 *Epichloë festucae* 染色体配列から 9833 の遺伝子上流配列 (各 1000 bp) を抽出し、SELEX-seq 解析で得られた濃縮前と濃縮後の配列をマッピングした。MACS プログラム (version 1.4.2) (Zhang et al., 2008) を用いて、濃縮前 DNA と比較し濃縮 DNA で特に高頻度でマッピングされた領域を検出した。上位 100 の領域中心の 100 bp をモチーフ予測プログラム MEME <http://meme.nbcr.net/meme/> (Bailey and Elkan, 1994) によって保存される推定モチーフを検索したところ、先に同定した ProA 結合プロモーター配列 GGCGC と類似のモチーフが見出された (図 3)。以上の結果から、 *E. festucae* 細胞内で ProA タンパク質が SELEX DNA の一部に直接結合することが示された。



図 3. MEME によって検出された推定 ProA 結合モチーフ

共生時特異的タンパク質群の共生確立過程における機能解析

SELEX-seq 解析によって見いだされた ProA に制御される共生時特異的タンパク質について、GFP との融合タンパク質を用いて、その発現部位を調査したところ、複数のタンパク質が細胞膜へ局在することを確認した。

共生時特異的タンパク質群の共生確立過程における機能解析

SELEX-seq によって特定されたプロモーター配列についてその下流に存在する遺伝子群は、ProA と同様に共生に重要な機能を果たす可能性が考えられた。そこで、これらの遺伝子破壊ベクターを作成し、野生株の形質転換を行った。10 遺伝子について遺伝子破壊株が得られ、そのうち 4 遺伝子 (*PtpA*, *PtpB*, *PtpC*, *PtpD*) の破壊株は細胞融合能が低下していた。

さらに、それらを宿主ペレニアルライグラスに接種したところ、いずれの破壊株でも宿主

の生育が低下し (図 4)、4 遺伝子が ProA に制御を受け細胞融合時に必要な遺伝子であることが示された。

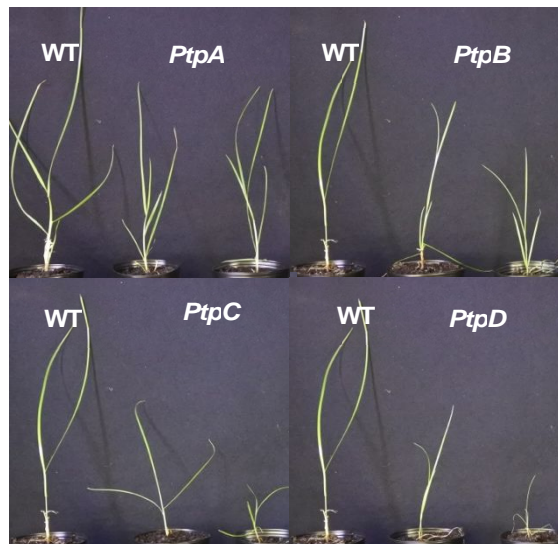


図 4. 変異株感染による植物の生育変化

< 引用文献 >

Zhang et al., (2008) Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 9: R137–R137.

Bailey and Elkan, (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 2: 28-36

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kayano Y., Tanaka A., Takemoto D. (2018) Two closely related Rho GTPases, Cdc42 and RacA, of the endophytic fungus *Epichloë festucae* have contrasting roles for ROS production and symbiotic infection synchronized with the host plant. *PLOS Pathogens*, 査読有, e1006840, DOI: 10.1371/journal.ppat.1006840
2. Green K., Becker Y., Tanaka A., Takemoto D., Fitzsimons H., Seiler S., Lalucque H., Silar P., Scott B. (2017). SymB and SymC, two membrane associated proteins, are required

for *Epichloë festucae* hyphal cell-cell fusion and maintenance of a mutualistic interaction with *Lolium perenne*. *Molecular Microbiology*, 査読有, 103, 657-677, DOI: 10.1111/mmi.13580

3. Shinjo R., Uesaka K., Ihara K., Loshakova K., Mizuno Y., Yano K. and Tanaka A. (2016). Complete Genome Sequence of *Kosakonia sacchari* Strain BO-1, an Endophytic Diazotroph, from Sweet Potato. *Genome Announcements*, 査読有, e00868-16, DOI: 10.1128/genomeA.00868-16

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 稲垣茉莉子, 神谷昇汰, 岡村文音, 榎野友香, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 田中愛子, 竹本大吾 イネ科牧草共生菌 *Epichloë festucae* の Cdc25 は RasB 活性化を介して細胞融合と共生確立に關与する. 日本植物病理学会, 2018 年 3 月 25 日, 神戸市
2. 稲垣茉莉子, 神谷昇汰, 岡村文音, 榎野友香, 佐藤育男, 千葉壮太郎, 川北一人, 田中愛子, 竹本大吾 牧草共生エンドファイトの細胞融合と共生確立に關与する Cdc25 および RasB の機能解析. 糸状菌分子生物学コンファレンス, 2017 年 11 月 16 日, 岡山市
3. 神谷昇汰, 榎野友香, 岡村文音, 丸山潤一, Barry Scott, 田中愛子, 竹本大吾 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の共生的感染を制御する 情報伝達因子の機能解析. 日本植物病理学会, 2016 年 3 月 21 日, 岡山市
4. 神谷昇汰, 岡村文音, 榎野友香, 田中愛子, 竹本大吾 牧草共生糸状菌 *Epichloë festucae* の Ras 活性化因子 Cdc25 は菌糸融合の形成に必須である. 日本植物病理学会関西西部会, 2015 年 9 月 29 日, 徳島市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本 愛子(田中 愛子)
(TAKEMOTO, AIKO)(TANAKA, AIKO)
名古屋大学・生命農学研究科・研究員
研究者番号：90464148

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()