

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03774

研究課題名(和文)植物病原性糸状菌における宿主由来の感染プライミング化合物の認識センサーの解明

研究課題名(英文) Study of plant factor(s) that induce infectious mechanism of fungal plant pathogens.

研究代表者

西村 麻里江 (NISHIMURA, MARIE)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・理事長補佐役

研究者番号：30370670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原性糸状菌は宿主植物由来の化合物を認識すると細胞壁構造を変化させて宿主免疫を回避し感染を成功させる。本研究では宿主植物由来の化合物をプライミング化合物と名付け、プライミング化合物が植物病原性糸状菌に対して細胞壁構造の変化以外のどのような感染行動を誘起するのかについて解析した。その結果、いもち病菌ではある宿主への感染に重要な因子の発現誘導にプライミング化合物が関与していること、灰色カビ病菌の感染にもプライミング化合物が重要な役割を持つことを示唆する結果を得た。さらに、プライミング化合物に応答して発現する遺伝子をビッグデータから効率的に抽出に適する新規の情報解析手法も併せて開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性微生物-宿主生物の相互作用研究は宿主生物側に立ったものが多い。病原性微生物が宿主を選ぶルールが明らかになれば、これまでと異なる見地からの感染防止策の開発に役立てることができる。本研究成果は植物病原性糸状菌(カビ)が何をもって植物を認識して感染しているのかを明らかにしようとしたものであり、新たなカビ病害に強い作物の開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Many fungal plant pathogens reorganize cell wall components upon recognition of chemical compounds derived from host plants. In this study, genes induced in response to host compounds in fungal plant pathogens were analyzed. Our results suggested that plant compounds, such as wax and carotenoid, are very important for full pathogenicity of some plant pathogenic fungi such as *Pyricularia oryzae*, the blast fungus, and *Botrytis cinerea*, the gray mold. A gene important for host infection in *P. oryzae* was induced by the host wax. *B. cinerea* became less pathogenic towards the host plant carrying a genetic defect in carotenoid synthesis. During this study, we developed a new informatics analysis method for efficient gene exploration from big data obtained by RNA sequencing analyses.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生物間相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は糸状菌細胞壁の必須構成多糖であるキチンや グルカンの分解酵素を持つ。これに対して、植物病原性糸状菌は植物にとって難分解性多糖である α -1,3-グルカンで細胞壁表層を覆うことにより、植物の細胞壁分解酵素から菌体を保護するという感染戦略をとる。 α -1,3-グルカンによる細胞壁保護は植物感染時に特異的に誘導されることから、植物病原性糸状菌では植物由来の因子の認識により細胞壁表層に α -1,3-グルカンを蓄積し、植物による菌の細胞壁への攻撃に備えると推測される (Nishimura M (2016) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95: 14-19)。細胞壁表層に蓄積した α -1,3-グルカンが鎧のように菌体を保護する役割を持つのに対して、植物病原性糸状菌はさらに感染時に特異的にエフェクター (植物相互作用に関わる分泌物質) 等の感染促進因子を分泌して植物に働きかけ、植物の免疫抑制などを介して感染を有利に進める (Presti et al., *Annu Rev Plant Biol.* 66:513-45, 2015)。エフェクター等の感染促進因子は病原菌の感染成立に必要であるが、感染促進因子の感染特異的発現を誘導する機構は殆ど明らかにされていなかった。

これまでの研究から、植物病原性糸状菌が特定の植物由来の化合物にตอบสนองして α -1,3-グルカン蓄積を行うことが見出されている。例えば、クチクラワックスの構成成分である 1,16-hexadecanediol はイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) に対して、 α -1,3-グルカン蓄積誘導活性を示すが、他の病原性糸状菌に対しては誘導活性を示さない。また植物カロテノイドである lutein は *Colletotrichum* 属菌やイネゴマ葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) に対して誘導活性を示すが、lutein に近い化学構造を持つ β -carotene は菌に対して α -1,3-グルカン蓄積誘導活性を示さない (Otaka et al., (2016) *Molecules* 21:980)。

2. 研究の目的

これまでの知見から、病原性糸状菌には特定の宿主由来の化合物の化学構造を認識する機構がある可能性が考えられた。そこで、1,16-hexadecanediol や lutein のように宿主由来で感染機構の誘導に作用する化合物を感染プライミング化合物と名付け、植物病原性糸状菌におけるその認識機構を解析するとともに、感染感染促進機構の発動への感染プライミング化合物の関与について解析を行うこととした。

3. 研究の方法

菌株

いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*)、多犯性植物炭そ病菌 (*Colletotrichum fioriniae*)、ゴマ葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) を本研究に用いた。培養には *P.oryzae* はオートミール寒天培地 (オートミール 3%、sucrose 0.5%、寒天 2%)、*C. fioriniae* および *B.oryzae* は Potato-dextrose agar (Difco) を用い、孢子形成条件下で 1 週間培養したものを試験に供した。

遺伝子発現解析

P. oryzae、*C. fioriniae* および *B.oryzae* の孢子を PD 液体培地で 24 時間培養したのに対し、感染プライミング化合物および、感染プライミング活性を有しない化合物 (構造類似化合物も含む) を 50 μ M ずつ添加し、一定時間培養後 RNA を抽出した。コントロールには化合物の溶媒のみを添加した。化合物を処理した菌糸から RNA を回収し RNA-seq 解析を行い、感染プライミング化合物に対して特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析

した。また、化合物で処理した菌糸や化合物を添加した胞子を一定時間培養後に RNA を抽出し、リアルタイム PCR 解析に用いた。

RNA-seq による遺伝子発現情報は、edgeR パッケージを用いて解析した (logFC、logCPM、P-value、FDR)。また、GenBank の nr-aa に対する 1st hit (putative protein などにより機能情報が得られない場合は 2nd hit 以降) の情報、COG+KOG に対する検索結果、InterPro Scan で得られた全ての検索結果から表 1 の Keyword を抜き出した情報を付加した。これにより、できるだけ信頼性の高い遺伝子の選択に努めた。

| | Keyword の選択条件 |
|----------------------|--|
| Membrane | containing "membrane" but without "mitochondria", "endoplasmic reticulum" and "goligi" |
| Transmembrane Domain | containing "TMhelix", "transporter", "transmembrane", "receptor", "channel", "membrane protein" and "CEFM" |

植物材料

シロイヌナズナは野生型及びルテイン低含量変異株 (いずれも Col-0 background) を用いた。各株の種子を培土 (パーミキュライトとサカタのスーパーミックス A が体積比 1 : 1 の割合で含有) に播種し、22 時間明期 / 14 時間暗期下で栽培した。播種後約 5 週齢の植物体を病原菌感染試験に供した。

植物への病原菌接種

C. fioriniae の孢子懸濁液 (2.0×10^4 孢子/ml) をシロイヌナズナ 1 個体当たり 2 葉に接種し (合計 6 個体用いた) 接種した植物体は 25 で栽培し、接種 10 日目に病斑の観察とその直径を測定した。灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) の孢子懸濁液 (5.0×10^4 孢子/ml) をシロイヌナズナ 1 個体当たり 2 葉に接種し (合計 6 個体用いた) 接種した植物体は 25 で栽培し、接種 6 日目に病斑の観察とその直径を測定した。

4 . 研究成果

1) 感染プライミング化合物により誘導される菌の遺伝子の解析

P. oryzae において、感染に関係する分泌タンパク質遺伝子の発現解析を行ったところ、1,16-hexadecanediol 添加 24 時間で発現が明らかに誘導される遺伝子が見いだされた。本遺伝子は lutein や β -carotene 等の植物由来の化合物による発現誘導は見られなかった (図 1)。破壊株の解析から、本遺伝子産物は少なくとも感染初期に分泌され、*P. oryzae* が宿主植物の 1 つに強い感染力を示すために必要な遺伝子であり、エフェクター様機能を持つと考えられた。

さらに、本遺伝子とおなじファミリーに属する遺伝子の発現を確認したが、いずれも 1,16-hexadecanediol による発現誘導が見られなかった。

この結果は、1,16-hexadecanediol が *P. oryzae* に対し感染プライミング化合物の 1 つとして認識され、感染促進機能を持つ (エフェクター様) タンパク質遺伝子の発現を誘導したことを示唆する。

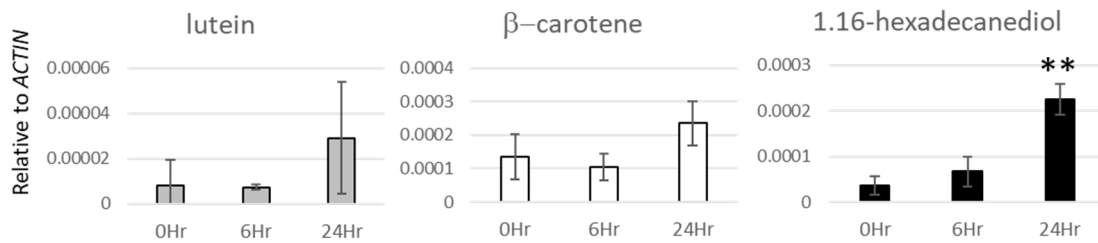


図1. 植物由来の化合物の添加による発現誘導

培地に植物由来化合物を添加後、0、6、24時間後の遺伝子発現を解析し、アクチンに対する発現比を示した。**は有意差 ($p < 0.01$, t-test) があることを示す。

植物病原性糸状菌において感染プライミング化合物の認識や応答に関わる遺伝子の選出を行うために、RNA-seq解析により得られたビッグデータに対して、効率的な目的遺伝子の抽出に適した新規の情報解析手法の開発を行った。遺伝子機能予測、比較ゲノム解析の手法を複合的に取り入れた新規手法により12000以上の全遺伝子からプライミング化合物に対して特異的に発現する候補遺伝子を55遺伝子まで絞り込むことができた。表1に55遺伝子の予想される機能を示す。

表1 感染プライミング化合物により発現が変動する遺伝子

| 遺伝子機能 | 遺伝子数 |
|-----------|------|
| トランスポーター等 | 13 |
| 代謝 | 13 |
| シグナル伝達 | 7 |
| 細胞構造 | 5 |
| 発現制御 | 5 |
| 機能未知 | 12 |

この候補遺伝子の中には細胞壁合成に関わると予測される遺伝子が含まれていた。このうちの1遺伝子が-1,3グルカン生合成に関わっていれば、本新解析手法が有用であると評価できる。そこで、本新解析手法の検証のために、*P. oryzae*を用いて本遺伝子の破壊株を作出した。遺伝子破壊株の形態は-1,3グルカン遺伝子欠損株同様に野生型を示した。詳細な機能については引き続き解析を行っている。

2) 植物内在性ルテインの感染応答への役割

植物の感染応答に果たす内在性ルテインの役割を明らかにするために、ルテイン低含量シロイヌナズナ変異株を用いて、*C. fioriniae*と*B. cinerea*に対する応答を接種後の発病程度を調べるにより検証した。*C. fioriniae*については、用いた系統がシロイヌナズナを宿主としないことが判明したため、結果は得られなかった。*B. cinerea*については、接種後に形成された病斑の大きさがシロイヌナズナ野生型と比較してルテイン低含量変異株では有意に小さくなっていた(図2)。この結果は、少なくとも*B. cinerea*のシロイヌナズナへの感染にはルテインが重要な役割を果たしていることを示唆する。

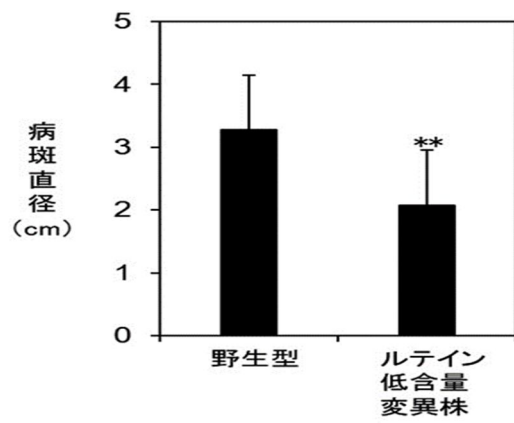


図2. 内在性ルテインは *B. cinerea* 感染に重要である

シロイヌナズナの各株に *B. cinerea* を接種し、接種後 6 日目の病斑の直径を測定した。

**は有意差 ($p < 0.01$, t-test) があることを示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 瀬尾 茂美 (SEO Shigemi) (80414910) | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主席研究員 (82111) | |
| 研究分担者 | 鬼頭 英樹 (KITO Hideki) (40455308) | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源センター・上級研究員 (82111) | |
| 研究分担者 | 町田 雅之 (MACHIDA Masayuki) (30358006) | 金沢工業大学大学院工学研究科・生命工学領域 バイオ・化学専攻・教授 (82626) | |