

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02206

研究課題名(和文) イネ紋枯病菌の病原性機構解明 エフェクタータンパク質の同定

研究課題名(英文) Virulence mechanism of rice sheath blight -Identification of effectors-

研究代表者

能年 義輝 (Noutoshi, Yoshiteru)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：70332278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌*Rhizoctonia solani*はイネ重要病害の紋枯病を引き起こす。本病の感染生理は未だよくわかっていない。本研究では、実験植物であるミナトカモジグサを用いたモデル感染系を用い、本菌の小型分泌タンパク質(エフェクター)遺伝子について、感染過程の発現変動を解析した。その結果、壊死誘導前の感染初期にこれらを使っていることを確認した。従来の認識とは異なり、本菌が宿主を殺す前に植物免疫を抑制する段階を経ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本菌は激しい壊死斑を誘導するため、宿主を殺して栄養を摂取する殺生菌に分類されています。本研究により、本菌は宿主を殺す前に組織内に侵入し、そこで分泌型のタンパク質であるエフェクターを放出することで、宿主免疫を抑制しながら寄生を成立させる活物寄生と呼ばれるステップを経ると推測されました。植物は活物寄生菌に対する効率的な免疫系を持つことから、その原理を利用した本菌への耐病性付与の有効性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：The filamentous fungus *Rhizoctonia solani* causes sheath blight, an important disease of rice. Its infection strategy remains unclear. In this study, we analyzed the expression of the small secretory protein (so-called effector) encoding genes of *Rhizoctonia solani* during the infection process in a model pathosystem developed using *Brachypodium distachyon*, an experimental monocotyledonous plant. As a result, we confirmed that the fungus uses them in the early infection stage before necrosis induction. In contrast to conventional recognition, it was suggested that the fungus undergoes a biotrophic stage of suppressing plant immunity before killing the host.

研究分野：植物病理学

キーワード：紋枯病菌 *Rhizoctonia solani* エフェクター 感染生理 ミナトカモジグサ イネ 活物寄生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネ紋枯病は水稻栽培において、いもち病と並ぶ二大病害に数えられ、アジア地域や米国で大幅な収量減少をもたらす。原因は土壌に生息する植物病原糸状菌 *Rhizoctonia solani* である。病害の克服には原因菌の生態や感染生理の理解に基づいた防除策の樹立と適用が必要である。しかし、本菌は細胞に複数の核を持つため遺伝子操作や遺伝学的解析ができず、全ゲノム配列が解読された現在に至っても(引用文献)、その病原性の分子機構はほとんど解明されていない。植物病原菌はその栄養摂取様式から、生きた宿主細胞の構造や養分調達機構を借用し、限られた宿主上でのみ増殖できる活物寄生菌、宿主を毒素等で殺して栄養を摂取する殺生菌、感染初期は活物寄生で後に宿主を殺すステージへと移行する半活物寄生菌に大別される(引用文献)。紋枯病菌は感染に伴って早期に激しい壊死斑を誘導することから殺生菌に分類されている。しかし、我々は実験単子葉植物であるミナトカモジグサを用いて確立した紋枯病菌のモデル感染系を通じた解析により、ミナトカモジグサには本菌に対して抵抗性を示す野生系統が存在することを見出した(引用文献)。この結果は、紋枯病菌が感染過程において宿主の免疫を抑えるために菌体外分泌タンパク質(エフェクター)を使っていること、および紋枯病に抵抗性を示すミナトカモジグサではそれらエフェクターの一部が抵抗性タンパク質で認識されて防御応答が発動されている、ことを示唆する。

2. 研究の目的

我々は、原因菌自体の解析が技術的に困難な紋枯病について、モデル植物を利用し、さらに宿主植物の免疫機構の側から迫る独自のアプローチにより、紋枯病菌は従来考えられてきたような単に宿主を殺して感染する様式ではなく、宿主免疫を抑え込みながら生きた細胞に寄生して感染する活物寄生段階を経ることを示す状況証拠を得た。そこで本研究では紋枯病菌が実際に宿主免疫を抑え込むために病原体が利用するエフェクタータンパク質を持っているのか、そしてそれらを感染時に使っているのかを調べ、植物側の解析から推測される本菌の感染行動の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

紋枯病菌のゲノム配列は解読されている。そこでゲノム情報からエフェクター候補タンパク質をコードする遺伝子を情報科学的手法で抽出する。そしてミナトカモジグサへの感染過程における時系列での発現変動を明らかにする。

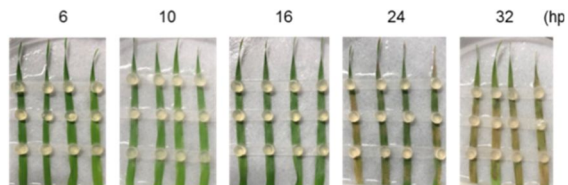
4. 研究成果

(1) ミナトカモジグサでの感染過程における遺伝子発現解析

ミナトカモジグサの葉身を切り取り、湿ったろ紙を敷いたシャーレ内に並べた。そして平板寒天培地(PDA)で生育させた紋枯病菌から調製した菌糸プラグを静置して感染させ、8、16、24時間でサンプリングし、RNAを抽出した。これを用いてRNA-seq解析(網羅的に転写物を解析する手法)を行った。本研究では感染初期における菌遺伝子の発現挙動の解析が目的だったが、8時間における本サンプルにおける菌由来RNAの割合はおよそ0.8%と非常に少量であり、菌遺伝子の発現変動を有意に解析することができないことが判明した。そのため、感染方法の改良を行うこととした。

(2) ミナトカモジグサを用いた紋枯病菌モデル感染系の改良

ミナトカモジグサの葉身に対し、パラフィルムを置いた上に菌糸プラグを乗せて感染させることとした(右図)。これは、菌糸プラグ直下から葉に感染するイベントを無くし、葉の上に進展した気中菌糸からの感染行動のみを追跡できることを期待したもので、結果としてサンプル中に含まれる侵入菌糸の感



染ステージの同調性の改善に繋がった。さらに一枚の葉に対する菌糸プラグの数を1個から3個に増やし、植物サンプル当たりの菌の量を増やした。この手法を用い、菌接種後、1、3、6、12、24、48時間の時点で感染葉をサンプリングし、葉表面の菌糸を粘着テープと70%エタノールを含む紙ワイパーで除去したサンプルからRNAを抽出した。菌の18S rRNA遺伝子を定量PCR法で確認したところ、菌接種後6時間の段階で安定的に菌由来RNAを検出できることがわかった。この実験系では菌接種後24時間の時点で葉の壊死の兆候となる黄化が確認されるが、それより大幅に早い段階で菌遺伝子の発現変動を検出するための実験系ができたことになる。なお、既に報告されているイネ上での感染過程で発現するとされる7個の紋枯病菌遺伝子(引用文献)の発現を定量PCR法で解析したところ、概ね発現パターンが一致することが確認できた。これにより、改良した感染系が想定通り機能すること、またミナトカモジグサとイネにおいて、本菌は概ね同様の感染様式をとり、本モデル系がイネ紋枯病の解析モデルとして有効であることが示された。

(3) エフェクター候補遺伝子の同定

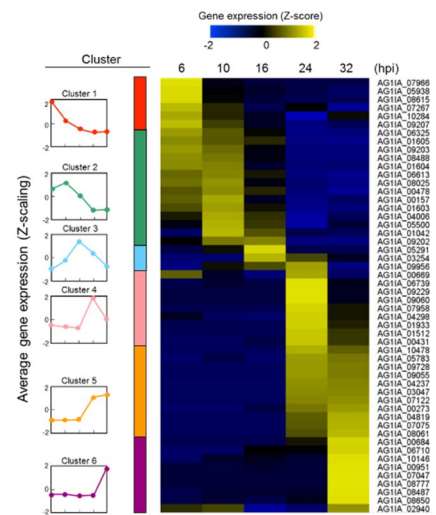
紋枯病菌ゲノム情報として登録されている全 10,541 個の予測遺伝子の推定アミノ酸配列のデータセットを用い、バイオインフォマティクス手法によりエフェクター候補遺伝子を抽出した。具体的には、小型で膜結合ドメインが無く、細胞外に分泌され、エフェクター様遺伝子と認められるものを、SignalP、TargetP、PredGPI、TMHMM、WolfPsort、EffectorP の各アルゴリズムを利用して特定した。結果として、88 個の遺伝子に絞り込まれた。

(4) エフェクター候補遺伝子の配列補正と再解析

特定されたエフェクター候補遺伝子について、定量 PCR 解析用のプライマーを設計し、(2)の RNA サンプルを用いて発現解析を行った。ところが幾つかのサンプルにおいて発現が検出されなかったり、増幅長が予想と異なるものがあることが判明した。そこで(1)の解析時にコントロールとして解析した PDA 培地上での生育菌系の RNA-seq 解析のリードデータをゲノム配列にマッピングしたデータを用い、公開されている遺伝子予測配列と比較した。結果として多くの遺伝子予測（開始コドン、終始コドン、エキソン-イントロンの位置）が間違っていることが判明した。そこで(1)で抽出した 88 個の遺伝子について、培地上での RNA-seq データを基に配列を補正した。そしてそれらの補正データを用いて改めてエフェクター予測を行った。補正により分泌シグナルがなくなったもの、アミノ酸配列の修正からアルゴリズムの基準に適合しなくなったもの、染色体の逆鎖上に強く発現する遺伝子が重なっており今後の解析に耐えないと考えられるものを除き、結果として候補は 61 個に絞り込まれた。

(5) エフェクター候補遺伝子の感染過程における発現解析

61 個のエフェクター候補遺伝子について、定量 PCR 法で感染過程における発現を解析した。結果として、52 個の遺伝子が少なくとも 1 つのサンプリング時間で発現していることが確認された。各遺伝子の各サンプリング時間における発現の変動の幅を Z スコア化し、その発現パターンを k-means クラスタリング法によって分類した。その結果、これらは 6 つのクラスターに分かれた (右図)。そして、病斑が形成される接種後 24 時間より前に発現する 23 個と、病斑形成後に発現する 26 個に分類された。病斑が形成される前に発現するものは、植物免疫を抑制するために宿主に放出される役割を担い、活物寄生段階の成立に寄与していると推測される。一方、病斑形成時に発現するものは、宿主細胞の壊死などに貢献する働きを持ち、殺生ステージの成立に寄与していると推測される (引用文献)。



(6) エフェクターの機能解析

病斑形成後に発現誘導されるエフェクター候補遺伝子のうち、10 遺伝子について cDNA をクローニングした。それらを植物細胞内で強発現するプロモーターの下流に連結する形でバイナリーベクターに組み込み、アグロバクテリウムを介してベンサミアナタバコ葉にインフィルトレーション接種法により導入した。この結果、供試したうちの 3 遺伝子が壊死斑を誘導した (未発表)。この結果から、感染過程における発現解析とそれをもとにした機能推定が予想通り行われたことが確認された。

(7) 紋枯病抵抗性を示すミナトカモジグサ野生系統の解析

我々は別途紋枯病菌に抵抗性を示すミナトカモジグサの野生系統 (Bd3-1, Tek-3) の解析を進めてきた。抵抗性系統と罹病性系統のそれぞれについて、紋枯病菌接種後の遺伝子発現変動を網羅的に解析し、それらの時系列変化についてネットワーク解析を行った。その結果、抵抗性ミナトカモジグサでは BdWRKY38 という転写因子が防御関連遺伝子のマスタースイッチとなっていることを明らかにした (引用文献)。本遺伝子を発現抑制したミナトカモジグサは紋枯病に対する抵抗性を喪失した。イネでは OsWRKY45 が防御応答を司る主要因子であることがわかっており (引用文献)、系統解によると、BdWRKY38 は OsWRKY45 のカウンターパートに相当する。なお、イネには実用に耐えるレベルの紋枯病抵抗性系統は存在しない。

これまでの解析により、我々はミナトカモジグサとイネにおいて、植物ホルモンであるサリチル酸を噴霧処理することによって紋枯病抵抗性が誘導されることを明らかにした。サリチル酸を分解する活性を持つ細菌由来の酵素遺伝子を導入したミナトカモジグサでは紋枯病抵抗性が喪失することも明らかにしている。サリチル酸は活物寄生菌に対する抵抗性を制御する免疫ホルモンであり、BdWRKY38 はサリチル酸応答の主要制御因子である。以上の結果、ミナトカモジグサの抵抗性系統は活物寄生菌が放出するエフェクターを感知する抵抗性タンパク質を持っており、それによってサリチル酸経路を活性化していると推測される。これと一致して、本研究では紋枯病菌がエフェクターと推定される小型分泌タンパク質を保持しており、それらが確かに壊

死を誘導する前の段階で既に発現していることを明らかにした。以上の結果は、紋枯病菌がその感染過程において、エフェクターを利用した活物寄生段階を経ているという仮説を支持した。

今後は、紋枯病菌は壊死斑を誘導する前に植物組織内に侵入してエフェクターを放出しているのか、エフェクター候補の中には宿主免疫の主要因子の働きを抑制できるものがあるのか、エフェクターを失うと感染できなくなるのか等の解析により、活物寄生段階の存在を詳細に明らかにする必要がある。また、cDNA 配列を母体として改めてエフェクター候補を探索することで新規エフェクター候補が得られる可能性もある。これらと並行して、ミナトカモジグサが紋枯病菌エフェクターを感知する仕組みについても明らかにする必要がある。これらの知見は、紋枯病菌の感染生理の正確な理解に繋がると共に、将来様々な植物種に紋枯病またはリゾクトニア病抵抗性を付与するための基盤として活用できる。

< 引用文献 >

- Zheng et al., Nat Commn (2013) 4:1424
- Glazebrook, Ann Rev Phytoathol (2005) 43:205-227
- Kouzai et al., BMC Plant Biol (2016) 16:59
- Kouzai et al., New Phytol (2018) 217(2):771-783
- Kouzai et al., New Phytol (2018) 8:17358
- Abdelsalam et al., Sci Rep (2020) 10:14889
- Kouzai et al., Plant J (2020) 104(4):995-1008
- Takatsuji, Front Plant Sci (2014) 5:630

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yusuke Kouzai, Yoshiteru Noutoshi, Komaki Inoue, Minami Shimizu, Yoshihiko Onda, Keiichi Mochida	4. 巻 8
2. 論文標題 Benzothiadiazole, a plant defense inducer, negatively regulates sheath blight resistance in <i>Brachypodium distachyon</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-35790-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 能年義輝	4. 巻 3
2. 論文標題 植物の病害抵抗性を高める物質	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 30-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sobhy S.H. Abdelsalam, Yusuke Kouzai, Megumi Watanabe, Komaki Inoue, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Seiji Tsuge, Keiichi Mochida, Yoshiteru Noutoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of effector candidate genes of <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA expressed during infection in <i>Brachypodium distachyon</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71968-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yusuke Kouzai, Minami Shimizu, Komaki Inoue, Yukiko Uehara Yamaguchi, Kotaro Takahagi, Risa Nakayama, Takakazu Matsuura, Izumi C. Mori Izumi, Takashi Hirayama, Sobhy S.H. Abdelsalam, Yoshiteru Noutoshi, Keiichi Mochida	4. 巻 104
2. 論文標題 BdWRKY38 is required for the incompatible interaction of <i>Brachypodium distachyon</i> with the necrotrophic fungus <i>Rhizoctonia solani</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 995-1008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14976	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sobhy S.H. Abdelsalam, 香西雄介, 渡邊恵, 井上小牧, 松井英謙, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 津下誠治, 持田恵一, 能年義輝
2. 発表標題 紋枯病菌がミナトカモジグサ感染時に発現するエフェクター候補遺伝子の探索同定
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiteru Noutoshi
2. 発表標題 An approach to study rice sheath blight disease using <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII Congress satellite meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouzai, Y., Inoue, K, Shimizu, M., Uehara, Y., Takahagi, K., Noutoshi, Y., Mochida, K.
2. 発表標題 Time-series transcriptome analysis of <i>Brachypodium distachyon</i> in response to the infection by <i>Rhizoctonia solani</i>
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abdelsalam, SSH., Isoya, S., Watanabe, M., Kouzai, Y., Matsui, M., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Toyoda, K., Tsuge, S., Noutoshi, Y.
2. 発表標題 Characterization of expression profiles of effector genes of <i>Rhizoctonia solani</i> on <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 2019 IS-MPMI XVIII Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kouzai, Y., Inoue, K, Shimizu, M., Uehara-Yamaguchi, Y., Takahagi, K., Noutoshi, Y., Mochida, K
2. 発表標題 Rapid activation of WRKY-dependent immunity facilitates native resistance against the sheath blight pathogen, <i>Rhizoctonia solani</i> , in <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 The 4th international <i>Brachypodium</i> conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 AbdelSalam, SSH., Isoya, S., Watanabe, M., Kouzai, Y., Matsui, M., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Toyoda, K., Mochida, K., Tsuge, S., Noutoshi, Y.
2. 発表標題 Characterization of expression profiles of effector genes of <i>Rhizoctonia solani</i> on <i>Brachypodium distachyon</i>
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小笠原翼, 香西雄介, 松井英讓, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 持田恵一, 能年義輝
2. 発表標題 イネ科モデル植物ミナトカモジグサの微生物分子パターン応答性の解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sobhy S.H. AbdelSalam, 渡邊恵, 松井英讓, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 香西雄介, 持田恵一, 津下誠治, 能年義輝
2. 発表標題 <i>Rhizoctonia solani</i> の感染初期過程に発現するエフェクター様遺伝子の同定
3. 学会等名 令和元年度日本植物感染生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小笠原翼, 香西雄介, 松井英謙, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 持田恵一, 能年義輝
2. 発表標題 モデル単子葉植物ミナトカモジグサの微生物分子パターン応答性の解析
3. 学会等名 令和元年度日本植物感染生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小笠原翼・松井英謙・山本幹博・一瀬勇規・豊田和弘・香西雄介・能年義輝
2. 発表標題 微生物分子パターンに対するミナトカモジグサの活性酸素種生成特性の解析
3. 学会等名 第53回植物感染生理談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小笠原翼・松井英謙・山本幹博・一瀬勇規・豊田和弘・香西雄介・能年義輝
2. 発表標題 微生物分子パターンに対するミナトカモジグサの活性酸素種生成特性の解析
3. 学会等名 H30年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubasa Ogasahara, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Yusuke Kouzai, Yoshiteru Noutoshi
2. 発表標題 Production of reactive oxygen species in <i>Brachypodium distachyon</i> to various microbe-associated molecular patterns
3. 学会等名 第1回オオムギ資源開発研究セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sobhy SH Abdelsalam, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Yusuke Kouzai, Seiji Tsuge, Yoshiteru Noutoshi,
2. 発表標題 Characterization of expression profiles of effector genes of Rhizoctonia solani on Brachypodium distachyon
3. 学会等名 第1回オオムギ資源開発研究セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 能年義輝, 磯谷怜, 渡邊恵, 香西雄介, Sobhy SH Abdelsalam, 松井英謙, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 津下誠治
2. 発表標題 紋枯病菌のエフェクター候補タンパク質のミナトカモジグサにおける病原性を評価するための白葉枯病菌を用いた異種発現系の構築
3. 学会等名 第1回オオムギ資源開発研究セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 香西雄介・井上小慎・清水みなみ、高萩航太郎、能年義輝、持田恵一
2. 発表標題 紋枯病菌感染後におけるミナトカモジグサの時系列比較トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 H31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

〔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	津下 誠治 (Tsuge Seiji) (10254319)	京都府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------