

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06056

研究課題名(和文)植物病原糸状菌による宿主プラスチド崩壊とデンプン分解の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular mechanisms of host plastid collapse and starch degradation by phytopathogenic filamentous fungi

研究代表者

八丈野 孝 (Yaeno, Takashi)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10404063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オオムギうどんこ病菌の侵入により表皮細胞内のプラスチドに含まれるデンプンが消失することを見出し、そのメカニズムを解明することを目的として、プラスチド局在型のGFPを発現させた形質転換オオムギ系統にデンプン結合型のmCherryを発現させ観察したところ、侵入部位付近では分散したGFP蛍光が観察されたが、プラスチドより小さい赤色蛍光が原形質流動に乗って細胞内に分散していく様子が見られ、崩壊したプラスチドから流出したことがわかった。APEC29の*in vitro*での活性調査については、大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の発現を試みたが封入体となったため引き続き調査を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オオムギうどんこ病菌の侵入時に宿主表皮細胞内のプラスチドが崩壊してデンプンが露出することが明らかになった。この研究によって栄養摂取メカニズムの全容が解明されることにより、表皮細胞に特化した防除法の開発につなげることができる。宿主表皮細胞内にあるデンプンの分解、吸収を阻害するような技術開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms underlying the reduction of starch in the plastids in epidermal cells during the penetration of barley powdery mildew pathogen (Bgh), transgenic barley lines expressing plastid-localized GFP and starch-bound mCherry were observed after infection with Bgh. Dispersed GFP fluorescence was observed near the site of penetration, but mCherry fluorescence smaller than the plastid was observed dispersing into the cell, suggesting that starch was leaked out of the collapsed plastid. For the analysis of APEC29 activity *in vitro*, recombinant protein expressing using *E. coli* has become an inclusion body, so we continue to try protein synthesis using other expression system.

研究分野：植物病理学

キーワード：オオムギうどんこ病菌 デンプン プラスチド崩壊 アミラーゼ エフェクター

1. 研究開始当初の背景

従属栄養を行う植物病原菌としては、炭素源として光合成産物である糖を摂取できる環境を構築することが感染成立の大前提である。葉肉細胞に感染するタイプの病原糸状菌は葉緑体由来の糖を豊富に得ることができるが、葉緑体が存在しない表皮細胞にのみ感染するタイプの病原糸状菌、例えばオオムギうどんこ病菌がどのようにして糖を得ているのかわかっていない。葉から単離した一層の表皮細胞にも感染し得ることから、近隣の葉肉細胞からの転流がなくても栄養摂取できることを意味する。そこで表皮細胞を調べたところデンプンを含むプラスチドが数多く存在することが明らかとなっていた。オオムギうどんこ病菌が付着器を形成して侵入を試みるタイミングでそれらのデンプンが消失することがわかったため、何らかのメカニズムでプラスチド内のデンプンを分解し、糖を吸収するという感染メカニズムの存在が示唆されていた。また、オオムギうどんこ病菌のプロテオミクス解析によりデンプン分解に関与すると想定される APEC29 が得られていたため、本菌は付着器形成時に APEC29 を宿主表皮細胞に送り込み、プラスチド内のデンプンを分解するのではないかと考えられていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、APEC29 タンパク質が宿主細胞内に移行するアミラーゼとして機能すること及びプラスチド包膜が崩壊することでデンプンが露出するメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

APEC29 のアミラーゼ活性と宿主表皮細胞内局在解析

APEC29 がアミラーゼとして機能するか確かめるために、リコンビナントタンパク質を作製して活性を測定する。当然のことながら、オオムギうどんこ病菌には光合成を行う能力がないためデンプンを合成することができない。アミラーゼ様配列を持つ APEC29 の役割としては宿主細胞が合成したデンプンを分解することであると考えるのが順当である。APEC29 がプラスチド内のデンプンを分解する能力を有するのかを検証するために、アミラーゼ活性を持つのかを調査する。また、プラスチドに移行するかどうかを GFP を融合させて蛍光顕微鏡で解析する。

デンプンを含むプラスチドの動態解析

オオムギうどんこ病菌の侵入後に表皮細胞内のデンプンが消失することを見出している。デンプンはプラスチドに内包されているため、プラスチドがどのような挙動を示すのかを解析する。具体的にはプラスチド局在シグナル配列を付加した GFP を発現させた細胞にオオムギうどんこ病菌を接種し、どのように変化するのかを調べる。

4. 研究成果

APEC29 がアミラーゼ活性を有するかを確かめるためにリコンビナントタンパク質の作製を試みた。N 末端に His タグを付加した APEC29 は大腸菌を用いて発現させることはできたものの不溶性となってしまった。C 末端に GST タグを付加した APEC29 も封入体を形成して不溶性画分になってしまった。そのため、タンパク質をリフォールディングさせてアフィニティカラムで精製することチャレンジしたがうまくいかなかった。グアニジンで可溶化後に透析膜中でゆっくりリフォールディングさせても不溶性になってしまった。しかし、ごく僅かではあるが可溶化したタンパク質が認められ、その他の夾雑タンパク質の除去にも成功したため現在 *in vitro* で活性測定に取り組んでいる。

APEC29 の C 末端に GFP 付加した APEC29-GFP をオオムギ表皮細胞内で発現させたところ、N 末端配列の有無に関わらずプラスチドには局在せず細胞質に局在することが明らかになった。この結果から、プラスチド内に含まれるデンプンを APEC29 が直接分解するとは考えにくいという結論に至った。

プラスチド局在シグナル配列を付加した GFP を発現させたオオムギ形質転換体 (tpGFP) を作製し、オオムギうどんこ病菌を接種したところ、侵入部位にプラスチドが集積し、プラスチドの形状に蛍光を発するものもあれば、不明瞭な GFP 蛍光が分散することが明らかになった。このことから、プラスチドが崩壊し、内部の GFP が流出したのではないかと考えられた。次に、デンプンに結合する GBSSI (Granule bound starch synthase) の C 末端に mCherry を付加したタンパク質を tpGFP 形質転換体に発現させ、プラスチド内部のデンプン粒をモニターできる実験系を構築した。そこにオオムギうどんこ病菌を接種すると、侵入部位付近では、プラスチドの GFP 蛍光に囲まれていない mCherry 蛍光が観察されることを発見した。緑色蛍光を発するプラスチドと比較して明らかにサイズが小さい赤色蛍光が原形質流動に乗って細胞内に分散していく

様子が見られ、侵入部位付近で崩壊したプラスチックから流出したことがわかった。以上の結果から、本菌の侵入時にプラスチックが崩壊し、内部のデンプンが露わになるという現象が起こることが示唆された。APEC29 はプラスチックに局在できないため、露出したデンプンを分解するのではないかと考えられた。プラスチック崩壊を引き起こす候補因子については複数同定しているがメカニズム解明には至っておらず、引き続き調査を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Islam Shaikhul, Bhor Sachin Ashok, Tanaka Keisuke, Sakamoto Hikaru, Yaeno Takashi, Kaya Hidetaka, Kobayashi Kappei	4. 巻 21
2. 論文標題 Impaired Expression of Chloroplast HSP90C Chaperone Activates Plant Defense Responses with a Possible Link to a Disease-Symptom-Like Phenotype	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4202 ~ 4202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124202	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 Kawamoto Yudai, Toda Hirotaka, Inoue Hiroshi, Kobayashi Kappei, Yamaoka Naoto, Araki Takuya, Yaeno Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Fast and Inexpensive Phenotyping and Genotyping Methods for Evaluation of Barley Mutant Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 1153 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9091153	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 Islam Shaikhul, Bhor Sachin Ashok, Tanaka Keisuke, Sakamoto Hikaru, Yaeno Takashi, Kaya Hidetaka, Kobayashi Kappei	4. 巻 21
2. 論文標題 Transcriptome Analysis Shows Activation of Stress and Defense Responses by Silencing of Chlorophyll Biosynthetic Enzyme CHL1 in Transgenic Tobacco	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7044 ~ 7044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197044	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 Ueda Kana, Nakajima Yuichi, Inoue Hiroshi, Kobayashi Kappei, Nishiuchi Takumi, Kimura Makoto, Yaeno Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Nicotinamide Mononucleotide Potentiates Resistance to Biotrophic Invasion of Fungal Pathogens in Barley	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2696 ~ 2696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052696	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 Sidiq Yasir, Nakano Masataka, Mori Yumi, Yaeno Takashi, Kimura Makoto, Nishiuchi Takumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Nicotinamide Effectively Suppresses Fusarium Head Blight in Wheat Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2968 ~ 2968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062968	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 Naoto Yamaoka, Eiji Tanaka, Tsubasa Ogasawara, Honoka Tani, Kappei Kobayashi, Takashi Yaeno	4. 巻 60
2. 論文標題 Formvar membrane laid on artificial medium induces haustorium-like structure formation in powdery mildew fungi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 298-301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.myc.2019.06.006	査読の有無 有
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 Koreyuki Sugai, Hiroshi Inoue, Chie Inoue, Mayuko Sato, Mayumi Wakazaki, Kappei Kobayashi, Masamichi Nishiguchi, Kiminori Toyooka, Naoto Yamaoka and Takashi Yaeno	4. 巻 9
2. 論文標題 High humidity causes abnormalities in the process of appressorial formation of <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9010045	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 Chen H., Ino M., Shimono M., Wagh S. G., Kobayashi K., Yaeno T., Yamaoka N., Bai G., Nishiguchi M.	4. 巻 110
2. 論文標題 A Single Amino Acid Substitution in the Intervening Region of 129K Protein of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus Resulted in Attenuated Symptoms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 146 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PHYTO-12-18-0478-FI	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 WAGH Sopan G., DASPUTE Abhijit A., AKHTER Shamim Md., BHOR Sachin A., KOBAYASHI Kappei, YAENO Takashi, NISHIGUCHI Masamichi	4. 巻 55
2. 論文標題 Relationship between Resistance to Rice necrosis mosaic virus and the Expression Levels of Rice RNA-dependent RNA polymerase (OsRDR6) in Various Rice Cultivars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japan Agricultural Research Quarterly	6. 最初と最後の頁 127 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6090/jarq.55.127	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 Yaeno Takashi, Wahara Miki, Nagano Mai, Wanezaki Hikaru, Toda Hirota, Inoue Hiroshi, Eishima Ayaka, Nishiguchi Masamichi, Hisano Hiroshi, Kobayashi Kappei, Sato Kazuhiro, Yamaoka Naoto	4. 巻 16
2. 論文標題 RACE1, a Japanese Blumeria graminis f. sp. hordei isolate, is capable of overcoming partially mlo-mediated penetration resistance in barley in an allele-specific manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0256574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0256574	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 Okuyama Satoshi, Matsuda Masafumi, Okusako Yuna, Miyauchi Sanae, Omasa Toshiki, Ozawa Akiho, Abe Masato, Yaeno Takashi, Araki Takuya, Sawamoto Atsushi, Nakajima Mitsunari, Furukawa Yoshiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Neuroprotective and Anti-Microglial Activation Effects of Tocotrienols in Brains of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroglia	6. 最初と最後の頁 89 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/neuroglia2010009	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 Masuda Sachiko, Yaeno Takashi, Shibata Hideaki, Yorozu Shuuhei, Yamamoto Satoki, Shirasu Ken	4. 巻 35
2. 論文標題 High-Quality Genome Sequence Resource of the Taro Pathogen <i>Phytophthora colocasiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 297 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-05-21-0120-A	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 Rahman Hafizur, Fukushima Chika, Kaya Hidetaka, Yaeno Takashi, Kobayashi Kappei	4. 巻 23
2. 論文標題 Knockout of Tobacco Homologs of Arabidopsis Multi-Antibiotic Resistance 1 Gene Confers a Limited Resistance to Aminoglycoside Antibiotics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2006 ~ 2006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042006	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 Yaeno Takashi	4. 巻 72
2. 論文標題 Suppression of Fusarium graminearum penetration by plant activators and the real-time bioimaging analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JSM Mycotoxins	6. 最初と最後の頁 43 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2520/myco.72-1-7	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川翔也・清水茜・吉田健太郎・小林活平・八丈野孝
2. 発表標題 レーザーマイクロインジェクション技術を用いたオオムギうどんこ病菌エフェクタータンパク質の単一細胞導入法の開発
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 井上博・久野裕・松島良・小林括平・山岡直人・西内巧・中神弘史・八丈野孝
2. 発表標題 オオムギうどんこ病菌の侵入部位 における宿主表皮細胞内プラスチド動態の解析
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 川本雄大・戸田寛隆・小川翔也・片山貴博・荒木卓哉・八丈野孝
2. 発表標題 オオムギTILLINGシステムの整備
3. 学会等名 第14回ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川翔也・清水茜・吉田健太郎・小林活平・八丈野孝
2. 発表標題 オオムギうどんこ病菌エフェクタータンパク質を単一細胞へ導入するためのマイクロインジェクション技術の開発
3. 学会等名 第14回ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上博・久野裕・松島良・小林括平・山岡直人・西内巧・中神弘史・八丈野孝
2. 発表標題 表皮細胞に感染するオオムギうどんこ病菌の栄養吸収メカニズムの解析
3. 学会等名 第14回ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上博・久野裕・松島良・小林括平・山岡直人・西内巧・中神弘史・八丈野孝
2. 発表標題 宿主表皮細胞におけるオオムギうどんこ病菌の栄養吸収メカニズムの解析
3. 学会等名 日本植物病理学会令和元年度（第54回）植物感染生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八丈野孝、小川翔也、長野真依、和原未季、小林括平、久野裕、吉田健太郎、山岡直人
2. 発表標題 オオムギうどんこ病菌の侵入に対するML0及びカルシウムイオンの動態解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川翔也、清水茜、小林括平、吉田健太郎、八丈野孝
2. 発表標題 レーザー熱膨張式マイクロインジェクション技術を利用したHR細胞死のシングルセル時空間解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和根崎洸、片山貴博、小出陽菜、熊倉直祐、Pamela Gan、井上智絵、香口智宏、小林括平、山岡直人、白須賢、西内巧、中神弘史、八丈野孝
2. 発表標題 ペルオキシソームを標的とするオオムギうどんこ病菌エフェクターAPEC1の病原性機能解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山貴博、和根崎洸、小出陽菜、熊倉直祐、Pamela Gan、井上智絵、香口智宏、小林括平、山岡直人、白須賢、西内巧、中神弘史、八丈野孝
2. 発表標題 オオムギうどんこ病菌エフェクターAPEC1が標的とするグリコール酸オキシダーゼの機能解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 在間玄香、井上博、久野裕、松島良、小林括平、山岡直人、中神弘史、八丈野孝
2. 発表標題 オオムギうどんこ病菌による宿主表皮細胞プラスチド内在デンブンの分解メカニズムの解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八丈野孝
2. 発表標題 ムギ類赤かび病菌感染のリアルタイムバイオイメーjing解析
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------