

機関番号：23303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780034

研究課題名（和文） 植物病原糸状菌が産生するオーキシンのビオトロフィック状態での侵入菌糸伸展への役割

研究課題名（英文） A role of auxin produced by phytopathogenic fungi during biotrophic phase

研究代表者

田中 栄爾 (TANAKA EIJI)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：50433199

研究成果の概要（和文）：イネいもち病菌は生きているイネの組織に侵入する。この研究によって、侵入菌糸先端にオーキシンが存在する結果を免疫組織化学的に得た。また、オーキシン応答レポーター遺伝子を導入したイネを用いて、いもち病菌侵入菌糸周辺のイネ細胞がオーキシン応答していることが示された。この結果は、ビオトロフィック状態の時に侵入菌糸が産生するオーキシンによって、イネ組織がオーキシン応答することを示唆している。また一方で、*in situ hybridization* 法によって宿主組織内のビオトロフィック状態の菌糸を種特異的に可視化できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* requires living plant cells in its early stages of infection and invasion of host tissue. Immunohistological analyses showed that antigens of the anti-indole-3-acetic acid monoclonal antibody were localized in the fungal infection hyphae present in the rice tissue. Rice transformants containing an auxin-inducible reporter construct demonstrated an auxin response around the apex of the infection hyphae after fungal invasion of living tissue. These results suggest that the rice blast fungus produces a small amount of auxin during its biotrophic phase and the invaded rice tissue responds to the exogenous fungal auxin. In addition, it was shown that the biotrophic fungal hyphae in host tissues were able to be visualized species-specifically by using *in situ hybridization* technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：

キーワード：菌類・細胞・組織・感染生理・植物

1. 研究開始当初の背景

多くの植物病原糸状菌は、宿主植物に侵入してから病徴発現に至るまでに、生きている植物組織内で栄養を得るビオトロフィック (biotrophic) 状態を経る。この時、葉肉組織の細胞間隙に菌糸を伸展するため、物理的な圧力とともに、植物細胞壁の分解酵素を分泌していると考えられている。しかし、細胞壁分解産物はエリシターとして

病徴発現を誘導することが多く知られているため、植物細胞壁分解酵素を用いた菌糸伸展機構は普遍的な機構であるとは考えられない。このことから、ビオトロフィック状態を示す菌は、これまで知られていない組織内伸展機構を有していることが示唆される。

一方で、多くの植物寄生菌がオーキシンを産生することが知られている。しかし、

もち病や縮葉病といった宿主の外形を変化させる病徴物質という観点以外に宿主植物との相互作用は明らかにされていなかった。植物生理学では、オーキシンの作用は植物細胞壁のセルロースマイクロフィブリル構造を緩めることにある。また、植物組織内では非常に低濃度で作用することが知られている。このようなことから、植物寄生菌が産生するオーキシンが、植物組織の細胞壁の構造を緩める可能性があると考えられた。

これまで、研究代表者は、いもち病菌とタケ類てんぐ巣病菌が培養液中でオーキシンを産生することを明らかにしている。そこで、これらの菌を用いて宿主組織内でのオーキシンの作用を調べようとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物寄生菌の産生するオーキシンが、植物組織内で細胞レベルの変化を誘導し、菌糸の組織内伸展促進物質として作用している可能性を示すことにある。そこで、ヘミビオトロフィックな寄生菌である"いもち病菌"と宿主イネの系、さらにビオトロフィックな寄生菌である"タケ類てんぐ巣病菌"と宿主タケの系をモデルとして用いた。

3. 研究の方法

(1) イネいもち病菌侵入部位におけるオーキシン局在の免疫組織化学的解析：

いもち病菌のイネ葉身への侵入時におけるインドール酢酸 (IAA) 産生の有無を免疫組織学的に解析した。まず、分生子懸濁液接種48時間後のイネ (日本晴) の葉身をカルボジイミド剤で処置し、遊離型 IAA を細胞中の蛋白質に固定した。次に、葉切片を作製し、anti-IAA モノクローナル抗体を一次抗体に用いて免疫反応をおこなった。この一次抗体をアルカリフォスファターゼ (AP) 標識二次抗体もしくは、Cy3 標識二次抗体により免疫反応をおこなった。AP 標識抗体は NBT/BCIP 系で発色させることにより、IAA の組織内局在を観察した。Cy3 標識抗体は、菌体表面を FITC 標識小麦胚芽レクチンで対比染色し、落射蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡により IAA の組織内局在を観察した。

(2) 侵入菌糸に対する葉肉組織細胞のオーキシン反応：

オーキシン応答プロモーター *DR5* とレポーター遺伝子 *GUS* のコンストラクト *DR5::GUS* は X-Gluc を基質としてオーキシンの局在部位を可視化する優れたレポーターとして植物

形態形成研究で盛んに用いられている。そこで、この *DR5::GUS* を導入した形質転換イネを用いて、イネいもち病菌侵入菌糸の近接部位におけるイネ葉組織のオーキシン応答の反応部位の観察を試みた。イネ内生オーキシンの影響を少なくするため、オーキシン極性輸送阻害剤 (NPA, TIBA) と作用阻害剤 (PCIB) をイネ系統 ZTS (北1菌株に対して感受性) の葉身の端部にそれぞれ塗布し、イネいもち病菌 (北1菌株) を噴霧接種した。接種3日後、イネ葉のオーキシン応答 *GUS* 発現部位を染色し、葉身を透明化した上で侵入菌糸を対比染色した後、光学顕微鏡で観察した。

(3) オーキシン過剰産生いもち病菌の作製と侵入感染への影響：

オーキシン産生能といもち病菌の感染侵入能の関連を調べるため、オーキシン過剰産生いもち病菌の作成を試みた。植物病原菌 *Fusarium oxysporum* のオーキシン過剰産生株は病原性が強くなる。その形質転換体作製法に従い、Indole-3-acetamide hydrolase 遺伝子 (*iaaH*: *A. nidulans gpdh* プロモーター制御) をいもち病菌に導入してオーキシン過剰産生株を作製した。この過剰生産株のイネへの感染侵入過程を観察する。

(4) イネ組織の細胞壁マイクロフィブリル構造への影響：

イネいもち病菌侵入菌糸が産生するオーキシンによって、イネの細胞壁構造が緩むのであれば、その場所にイネのエキスパンシンが発現していることが予想される。そこで、イネのエキスパンシン発現部位を組織学的に解析するため、エキスパンシン抗体を用いた免疫組織化学染色と、エキスパンシン mRNA を標的とした *in situ hybridization* (ISH) をおこなった。

(5) 植物組織内に伸展する菌糸の特異的検出：

植物組織内で生育するビオトロフィック状態の菌糸と植物の相互作用を観察するためには、ビオトロフィック状態の菌糸を種特異的に識別できなければならない。そこで、ISH を用いて種特異的に検出する手法を開発した。ビオトロフィックな状態で通常生育するタケ類てんぐ巣病菌を対象として、18S rRNA を標的とした種特異的オリゴヌクレオチドプローブを作製した。このプローブをジゴキシゲニンで標識し、ジゴキシゲニンに対する AP 標識二次抗体を NBT/BCIP 系で発色させることにより、宿主組織の菌糸を種特異的に観察した。

4. 研究成果

(1) イネいもち病菌侵入部位におけるオーキシン局在の免疫組織化学的解析：

免疫組織染色の結果、いもち病菌の侵入菌糸先端にIAA抗体の反応が見られた(図1と2)。これにより、イネ組織侵入時に、いもち病菌の侵入菌糸先端でIAAが産生されていることが示唆された。

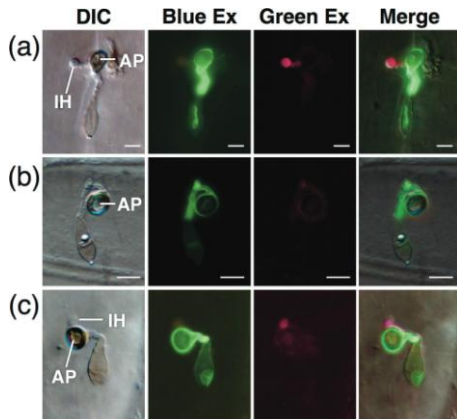


図1. タマネギ表皮細胞に接種し発芽したいもち病菌のIAA抗体に対する免疫染色 いもち病菌の分生子が発芽し、付着器(AP)を作り、侵入菌糸(IH)がタマネギ表皮細胞に侵入している。微分干渉顕微鏡像(DIC)・蛍光像との合成(Merge)・青色光励起(Blue Ex)・緑色光励起(Green Ex)・菌体はWGA-FITCによって緑色に示される。IAAモノクローナル抗体はCy3二次抗体によって検出され、マゼンタで示される。バー=10 μm。(a)カルボジミド剤前固定、接種後16時間。(b)接種後24時間。(c)カルボジミド処理せず、接種後40時間。

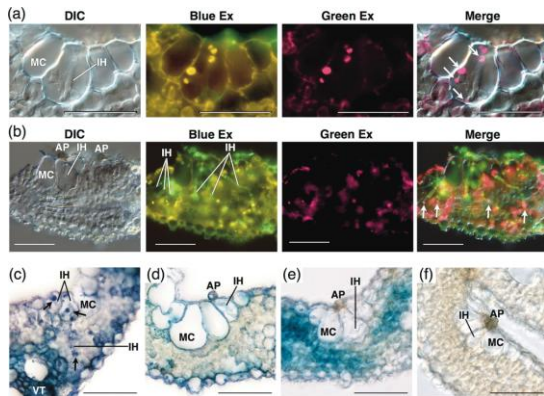


図2. いもち病菌を接種したイネ葉切片のIAA抗体に対する免疫染色。いもち病菌は付着器(AP)から機動細胞(MC)に侵入。バー=50 μm。(a and b) 微分干渉顕微鏡像(DIC) 蛍光像との合成(Merge)。IAA抗体はCY3結合二次抗体で検出。緑色光励起(Green Ex)にてマゼンタで表示。青色光励起(Blue Ex)にて黄色で表示。青色光励起にて緑色で表示されるのはWGA-FITCによって染色された菌体。IAA抗体は、侵入菌糸(IH; 矢印)先端に表出されている。(a)機動細胞中の侵入菌糸(IH)。(b)葉肉組織中の侵入菌糸(c)アルカリフォスファターゼ結合二次抗体でNBT/BCIP染色により示されるIAA抗体の免疫染色。青色がIAA抗体の場所。IAAは侵入菌糸(IH)と維管束組織(VT)で検

出された。(d-f)対照区(d)カルボジミド処理なし。(e)一次抗体なし。(f)二次抗体なし。

(2) 侵入菌糸に対する葉肉組織細胞のオーキシン反応：

GUS発色の結果、侵入菌糸に近接するイネ細胞にGUS活性が検出された(図3)。すなわち、いもち病菌侵入菌糸が産生するオーキシンに対して、イネ細胞が応答していると考えられた。

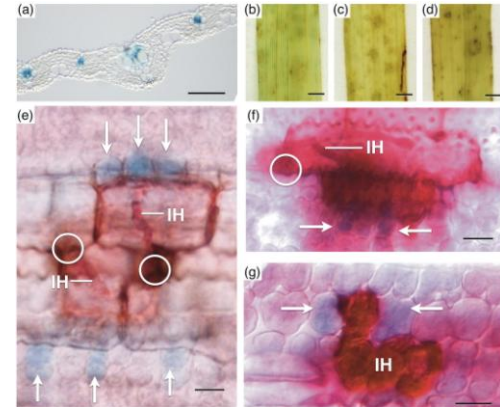


図3. DR5::GUS導入イネのGUS活性によるオーキシン反応の組織学的検出。(a)イネ葉切片のGUS活性。維管束組織で検出される。バー=100 μm。(b-d)イネ葉のGUS活性。バー=1 mm。(b) GUS activities are shown in leaf veins. (c and d) PCIB (c)もしくはNPA (d)をイネ葉の先端と基部に塗布。GUS活性は(b)と比較して減少している。(e-g)いもち病菌を接種したイネ葉のGUS活性。PCIBもしくはNPA処理。侵入菌糸(IH)は赤色で示している。バー=10 μm。(e and f)機動細胞中の侵入菌糸。GUS活性(矢印)が侵入菌糸に接する葉肉細胞にみられる。(g)GUS活性(矢印)が侵入菌糸のあたりに見える。白丸は付着器がある場所。

(3) オーキシン過剰産生いもち病菌の作製と侵入感染への影響

予定していたプラスミドは作製できた。現在、このプラスミドのイネいもち病菌への導入を試みている。まだ、オーキシン発現過剰株の作出は成功していない。

(4)イネ組織の細胞壁マイクロフィブリル構造への影響：

イネのエクспанシンA遺伝子のうち5つに対してmRNAを標的としてRNAプローブを作製しISHをおこなった。また、エクспанシンBに対する抗体を用いた免疫染色もおこなった。いもち病菌がビオトロフィック状態のイネ葉切片を用いて解析した結果、ビオトロフィックな侵入菌糸伸展時に侵入菌糸先端付近のイネ葉鞘組織にエクспанシンが発現している可能性があるものの、明確な結果が得られなかった。

(5) 植物組織内に伸展する菌糸の特異的検出:
 作製したオリゴヌクレオチドプローブの反応特異性を試験するため、ゲノム DNA を供試して dot-blot hybridization をおこなった結果、バツカクキン科の近縁菌には反応せずタケ類てんぐ巣病菌にのみ種特異的に反応することを確認した (図 4)。

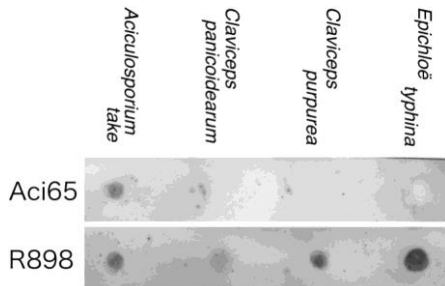


図 4. 種特異的オリゴヌクレオチドプローブ (Aci65) 確認のための Dot-blot hybridization. *A. take* 18S rRNA を標的とした種特異的プローブ Aci65 は *A. take* ゲノムにのみ陽性を示す。ユニバーサルプローブ R898 は他のバツカクキン科菌にも陽性を示す。

ISH には、タケ類てんぐ巣病菌に感染したモウソウチクの「標徴を含むシュート」と「罹病部位の無標徴シュート」をホルマリン固定・パラフィン包埋して作製した組織切片を用いた。ISH では種特異的のプローブ (Aci65) 使用区の外、ポジティブコントロールとして真菌汎用のオリゴヌクレオチドプローブ (R5) 使用区、ネガティブコントロールとしてプローブ未使用区と Aci65 相補配列のオリゴヌクレオチドプローブ (Non-Aci65) 使用区を設定した。

ISH の結果、「標徴を含むシュート」においては、子座、子嚢殻、子嚢、擬柔組織など本菌の組織のみに発色を認めた (図 5)。「罹病部位の無標徴シュート」においては、縦断切片と横断切片を供試し、宿主植物組織中に存在する菌体の発色を認めた。まず、シュート頂の茎頂分裂組織周辺と葉原基組織の細胞間隙に集中的に菌体を検出した。さらに、少なくとも先端から 4 つ目までの側芽組織の細胞間隙に菌体を検出した。また、わずかに節間の組織と葉鞘組織の細胞間隙にも菌体を検出した。

この結果から、本菌は主にシュート頂の茎頂分裂組織周辺に Endophytic に生育し、罹病部位の節間、側芽、葉鞘の組織の細胞間隙にも生育していることが明らかになった。この生育場所がてんぐ巣症状発生に関係していると考えられる。また、植物組織中のエンドファイトを種特異的に高感度で検出することができたため、ISH が宿主組織内の寄生菌を観察する有効な手段であることを示した。

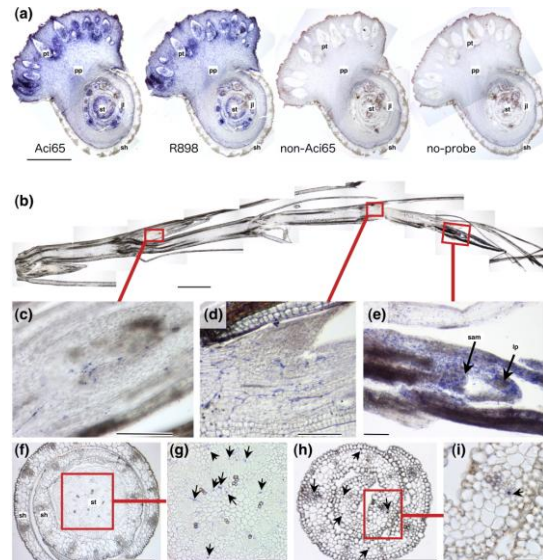


図 5. タケ類てんぐ巣病菌に対する種特異的検出. (a) ジオキシンゲン標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた子嚢子座連続切片に対する ISH. ハイブリダイゼーションシグナルは青紫色で示される。種特異的のプローブ (Aci65) は偽柔組織 (pp), ペリテシア (pt) 子嚢など菌体組織に見られた。若い葉 (jl) や茎 (st) にも見られる。葉鞘 (sh) や上皮組織には見られない。陽性対照プローブ (R898) は Aci65 プローブと同様。陰性対照プローブ (non-Aci65, Aci65 プローブの相補鎖) とプローブ無しではシグナルは見られない。バー=1 mm. (b) 縦断切片。バー=1 mm. (c) 4 番目の脇芽に見られる菌糸。バー=100 μm. (d) 2 番目の脇芽に見られる菌糸。バー=100 μm. (e) シュート先端分裂組織 (sam) と葉原基 (lp)。バー=100 μm. (f) 横断切片。シュート (st)、葉鞘 (sh)。シグナルは葉鞘には見られない。バー=500 μm. (g) 菌糸 (矢印) は茎の細胞間隙にみられる。バー=100 μm. (h) 若葉の横断切片。菌糸 (矢印) が細胞間隙に見られる。バー=500 μm. (i) 菌糸 (矢印) が維管束組織の細胞間隙に見られる。バー=100 μm.

(6) まとめ

植物寄生菌が産生する外生のオーキシシンと植物の内生オーキシシンとを識別することは困難である。今回の研究では、免疫染色や形質導入イネを用いることにより、外生のオーキシシンの識別を試みた。これらの結果、ビオトロフィック状態で侵入菌糸がオーキシシンを産生していることが示唆された。目的としていた宿主組織内での侵入菌糸の伸展促進として作用するかどうかは、今回の研究では明らかにできなかった。しかし、たとえ微量でもオーキシシンは植物組織に影響するため、植物寄生菌の産生するオーキシシンが宿主植物に何らかの影響を与えることは確実である。すなわち、真菌と植物の相互作用を考える上で、これまで知られていない関係があることを示す重要な知見となる。また一方で、植物組織内で種特異的に菌糸を可視化する方法を確立したため、今後この手段を適用して宿主組織内での寄生菌の相互作用を明らかにしていくことが可能となった。

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 2 件)

- ① Eiji Tanaka, Hironori Koga, Mari Mori and Masashi Mori: Auxin production by the rice blast fungus and its localization in host tissue. (2011) Journal of Phytopathology. 査読有 In Press. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2011.01799.x
- ② Eiji Tanaka. Specific in situ visualization of the pathogenic endophytic fungus *Aciculosporium take*, the cause of witches' broom in bamboo (2009) Applied and Environmental Microbiology, 査読有 75: 4829-4834

[学会発表] (計 5 件)

- ① Eiji Tanaka. Species-specific visualization of endophytic fungus in host plant tissue by *in situ* hybridization. Asian Mycological Congress 2009. 2009 年 11 月 台湾台中市
- ② 田中栄爾・古賀博則. イネいもち病菌感染時におけるエキスパンシン発現の組織学的解析. 日本植物病理学会関西西部会 2009 年 10 月 神戸市
- ③ 田中栄爾・森真理・森正之・古賀博則. イネいもち病菌侵入菌糸の近接部位におけるイネ葉組織のオーキシシン応答. 植物病理学会関西西部会 2008 年 9 月 和歌山市
- ④ Eiji Tanaka. Detection and localization of *Aciculosporium take*, the causal fungus of witches' broom of bamboo, in host tissue by *in situ* hybridization. Japan-China Pan Asia mycological forum 2008. 2008 年 7 月 中国吉林省長春
- ⑤ 田中栄爾. *In situ* hybridization によるタケ類てんぐ巢病菌 (*Aciculosporium take*) の宿主組織における局在検出. 日本菌学会 2008 年 5 月 三重県津市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 栄爾 (TANAKA EIJI)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授
研究者番号：50433199