

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06052

研究課題名(和文)植物病原糸状菌における細胞周期の可視化と病原性に及ぼす影響評価

研究課題名(英文)Visualization of cell cycle in phytopathogenic fungus *Pyricularia oryzae*

研究代表者

池田 健一 (Ikeda, Kenichi)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40437504

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)：いもち病菌の細胞周期を評価するために、市販のFucciシステムをいもち病菌用に改造し、変異株を得ることに成功した。それら変異株を用いて細胞周期を評価したところ、いもち病菌が付着器を形成する過程において、細胞周期が1周していたが、親水性で付着器を形成しない場合には明確な細胞周期の変動が認められず、根の感染と類似したプラズマ照射シャーレ上においては、細胞周期が加速していることが明らかとなった。これら細胞周期の変動は、ヒストンH1をRFPで標識した変異株を用いた核の分裂様式評価との結果とも合致するものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いもち病菌は植物病原糸状菌においてモデルとなっており、その複雑な病原性発現機構を理解することは、病害防除に向けて重要である。胞子が発芽する過程において、どのように細胞周期を調節しているのかを明らかにすることにより、外部環境をどのように感知し、どのような仕組みで制御されているのかを明らかにするために、まずは細胞周期をモニタリングできる技術の構築を試みる。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the cell cycle of rice blast fungus, I modified the commercially available Fucci system for rice blast fungus and succeeded in obtaining mutant strains. When the cell cycle was evaluated using these mutant strains, it was found that the cell cycle was one cycle in the process of appressorium formation in the blast fungus. In contrast, no change was observed on the hydrophilic surface, and the cell cycle was accelerated on the plasma-irradiated petri dishes similar to root infection. These cell cycle changes were consistent with the evaluation of the nuclear division pattern using an RFP-labelled histone H1 strain.

研究分野：植物保護

キーワード：いもち病菌 *Pyricularia oryzae* *Magnaporthe oryzae* 付着器 細胞周期 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

いもち病菌の分生子は宿主葉上で水分を含んだ条件で発芽を開始する。発芽した菌糸には胞子先端より核が移行し分裂を行い、一方の核は再び胞子細胞へ戻る。宿主葉上においては、発芽菌糸先端部位に付着器が形成される。この付着器は物理的あるいは化学的シグナルにより宿主葉に存在していることを検知することで誘導される。形成された付着器の内部では高い膨圧が生み出され、その圧力を利用して宿主侵入に成功する。この一連の過程においては、様々な遺伝子発現変動、メラニン化や糖や脂質等の代謝変動やオートファジーの活性化が伴っている。その一方で、いもち病菌は根においても感染できることが明らかとされた。根への感染過程においては、付着器を形成せずに菌足 (hyphopodium) を形成し、菌足ではメラニン化が起こらず、オートファジーの活性化も必要としない。このようにいもち病菌は外部環境を認識し、細胞の代謝を変化させている。この仕組みがどのような機構で制御されているのか、興味を持たれるところである (図1)。細胞周期は細胞分裂に伴う様々なチェックポイントを備えており、遺伝子発現調節にも大きく関わっていることが考えられる。分子生物学的解析において、細胞周期に関わる遺伝子を温度感受性に改変した変異株を用いた解析において、細胞周期が機能しなくなると病原性を失うことが示された。

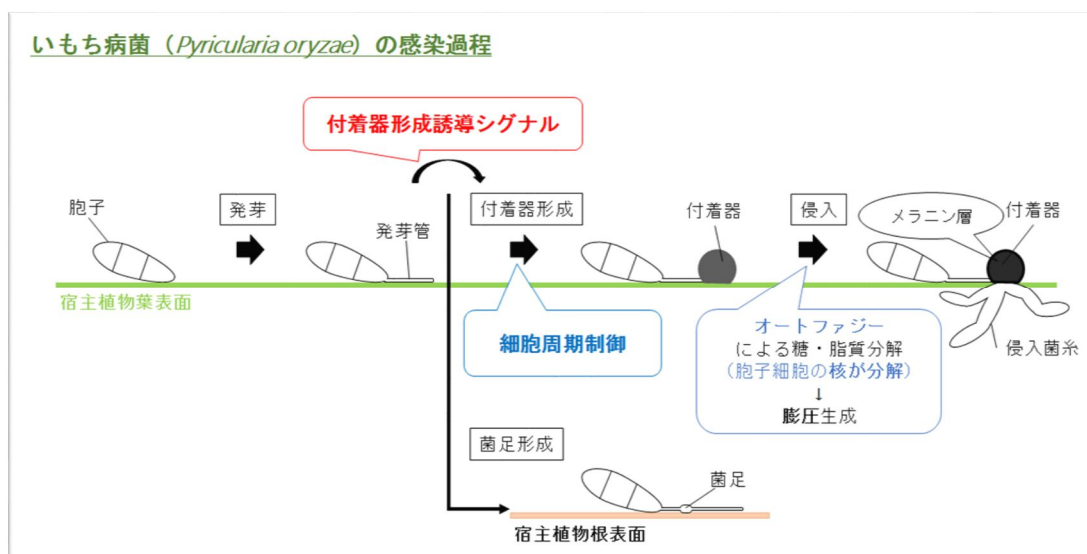


図1. いもち病菌の宿主植物における感染過程

2. 研究の目的

本研究課題では、いもち病菌において細胞周期が宿主侵入に及ぼす影響について着目した。まず、いもち病菌の核を可視化し、胞子発芽過程における核の分裂様式を評価した。胞子が発芽する際に物理的、化学的性質の異なる基盤を用意し、付着器を形成する場合とそれ以外の条件において細胞分裂がどのように変化するのか調査した。さらに、細胞周期の状態を可視化することを試みた。これを実現するために、G1期とM/G2/S期を区別することのできるシステム Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) を糸状菌に導入することを試みた。

さらに、これら細胞周期は、様々な代謝変動とも関連していることが考えられたことより、糖や脂質が発芽過程においてどのように代謝されているのか、さらにその代謝に関わっていると考えられるオートファジーの誘導がどのように制御されているのか解析を試みた。

3. 研究の方法

いもち病菌の核を可視化するために、ヒストンH1タンパク質にRFPを融合したプラスミドを導入した変異株 H1-RFP 株を用いた。付着器を形成する疎水性条件としてカバーガラス表面、付着器を形成しない親水性条件として Gelbond フィルムを用いた。さらに、根表面と特徴が似ており、付着器ではなく菌足を形成することが知られているプラズマ照射処理したプラスチックシャーレ表面も用いた。Fucci システムとして、市販されている pFucci-G1 Orange, pFucci-S/G2/M Green Cloning vector (MBL ライフサイエンス社) を購入した。これを糸状菌で機能させるために、プロモーターとして、*P_{trpC}* 配列を挿入した。新たに構築

したプラスミドをいもち病菌に導入し、得られた変異株を実験に供試した。これら変異株について、核を可視化観察した際に用いた基質に接種し、蛍光の変化を経時的に観察した。糖や脂質の代謝に関しては、グリコーゲンをヨウ素染色、トリアシルグリセロールを Bodipy という試薬を用いて可視化した。また、オートファジーは核の分解を伴う反応であることが報告されていることより、H1-RFP 株を用いて、それぞれの細胞における核の有無で評価した。

4. 研究成果

1) 核分裂の変化

孢子発芽過程における核分裂の様子について経時的に評価した(図2)。付着器を形成する疎水性条件においては、発芽した菌糸にて孢子由来の核が移行し、核分裂を行い、一つの核は孢子へ戻り、もう一つの核は付着器を形成した細胞に局在して分裂を停止した。その後、発芽した孢子細胞の反対側の細胞の核が分解を始め、続いて孢子中央の細胞の核が分解し、最後には発芽した孢子の細胞の核が分解し、孢子に含まれていた3細胞の核は全て消失した。この分解にはマクロオートファジーが関与しており、葉へ感染する際の重要な役割を果たしていることが考えられている。このような付着器形成に伴う核の分裂・消長と比較して、付着器を形成しない条件においてどのような違いが認められるのか調査した。

Gelbond フィルム上は親水性であり、いもち病菌孢子は発芽しても菌糸を伸展させるのみである。発芽菌糸の分岐もほとんど認められなかった。このような条件における核の分裂を評価したところ、発芽菌糸において隔壁の形成を伴って、細胞分裂が繰り返されていた。また、プラズマ処理シャーレ表面に接種したところ、菌足を形成し、そこから Pre-infection hyphae (Pre-IH) と呼ばれる細胞表面の構成成分が発芽菌糸と異なる菌糸を分岐させた。この過程においても、隔壁の形成を伴って、細胞分裂が繰り返されていた。また、Pre-IH 形成時の菌糸における細胞分裂・核分裂の速度は親水性条件よりも早い傾向が認められた。

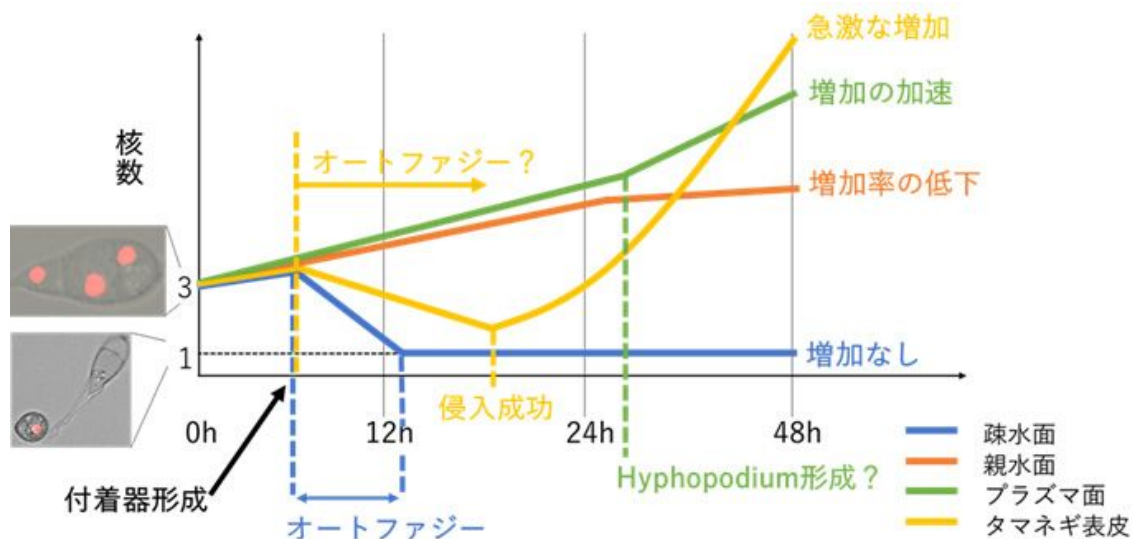


図2. 異なる基質上におけるいもち病菌の核の増殖過程

2) いもち病菌における Fucci システムの導入

Fucci システムは G1 期を緑色蛍光に、M/G2/S 期を橙色蛍光となるような二つのプラスミドを利用した。糸状菌において発現するように P_{trpC} プロモーターで制御されるように改変した Fucci プラスミドを構築し、いもち病菌に導入した。得られた変異株を用いて緑色・赤色蛍光を観察した。栄養菌糸を観察したところ、生育が旺盛な菌糸先端領域は S/G2/M 期を示していた。一方、生育(細胞分裂)が停止状態のコロニー中央領域では G1 期であった。また、S 期で停止する作用を持つハイドロキシウレアを処理した際には、赤色に観察され、G2/M 期で停止するベノミルを処理した際には緑色蛍光で観察された。このことから、設計したプラスミドは糸状菌において細胞周期の状態を適切に表現できていることが確認された。

この変異体を用いて孢子発芽過程の蛍光顕微鏡観察を行った。孢子懸濁液滴下処理直後は G1 期を示しており、付着器形成過程においては S/G2/M 期を経て再び G1 期へと移行した。付着器形成の認められなかった親水性条件においては、蛍光強度に明瞭な変化が認められなかったことより、細胞周期の変化を確認することはできなかった。一方、プラズマ処理シャーレ表面においては細胞周期の変化が付着器形成よりも早く進行していることが明らかとなった。このことは、プラズマ処理シャーレ表面における H1-RFP 株を用いた核の分裂評価の結果と同様のものではなかった。

研究を続けたところ、長期保存した Fucci 変異株を再生した際に、緑色・赤色蛍光が減退し

ていく現象が認められた。この要因として、Fucci システムに用いていた蛍光タンパク質がサンゴ由来であり、コドン頻度やエピジェネティック制御が働いた可能性等が考えられた。そこで、プロモーター配列を *P_{trpC}* だけでなく、*P_{gpd}* 配列も利用した点、蛍光タンパク質を EGFP に置換する等の工夫を行った。その結果、G1 期をモニターできる変異株は得られたが、M/G2/S 期をモニターする変異株は得られなかった。M/G2/S 期をモニターするために利用している *geminin* 配列を含んだプラスミドは形質転換できて変異株は得られたが、蛍光が消失することは無かった。*Geminin* 配列は G1 期にユビキチン化により分解を受けるターゲットとなる配列であるが、これが GFP と結合している場合には、適切に分解されない可能性が考えられた。G1 期のみをモニターできる変異体を用いて追試実験を行ったが、これまでと同様の結果が得られた (図 3、4)。

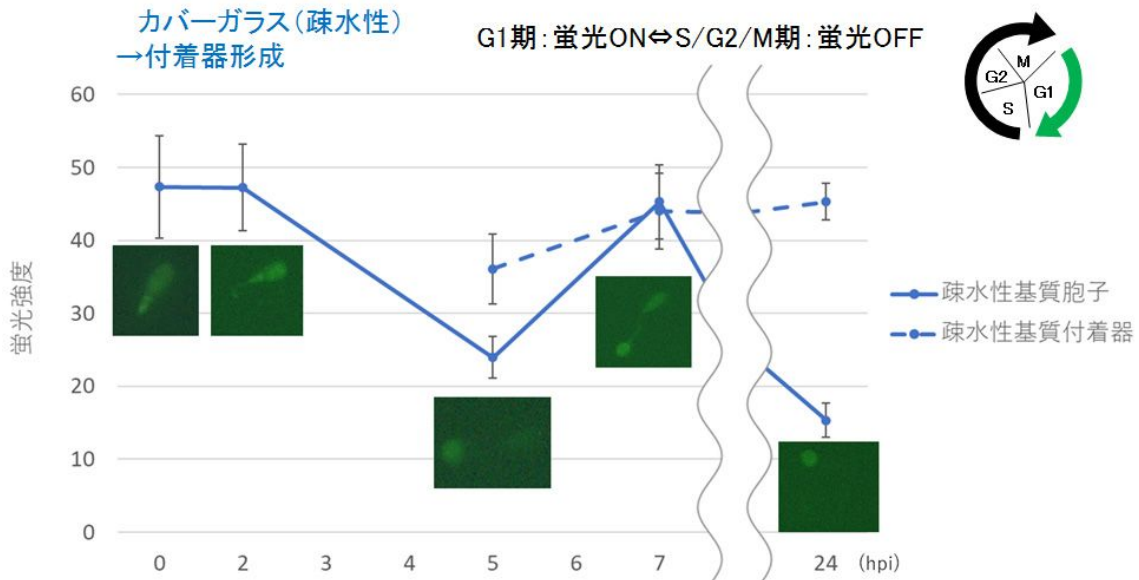


図 3 . いもち病菌の付着器形成過程における S/G2/M 期を指標とする蛍光強度

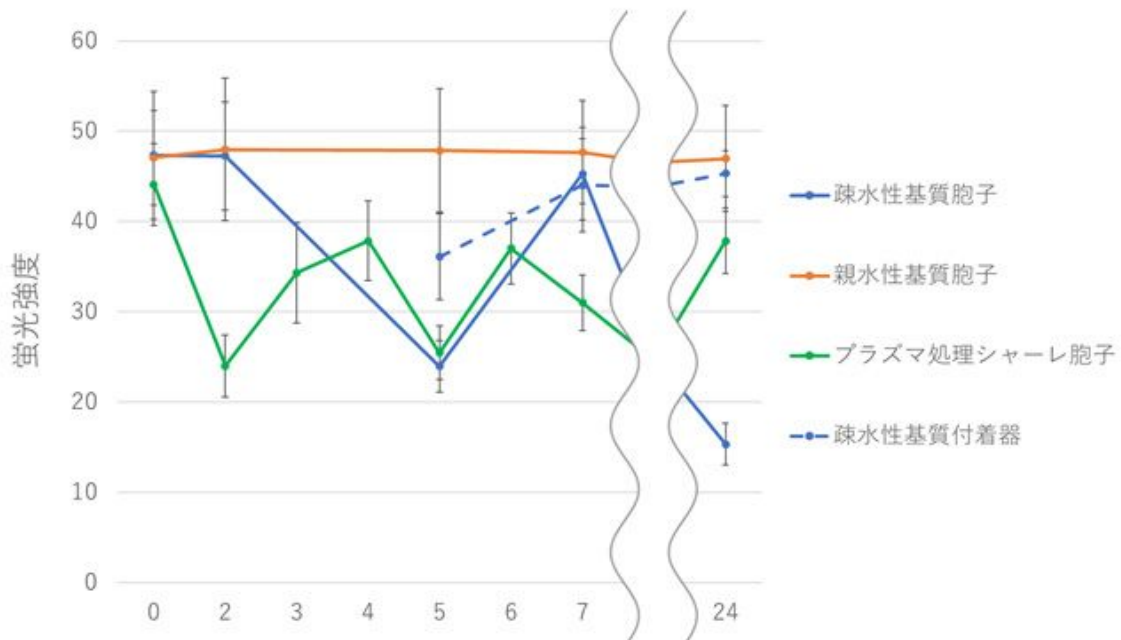


図 4 . いもち病菌の各種人工基質上における S/G2/M 期を指標とする蛍光強度

3) 糖・脂質代謝・オートファジー活性の評価

胞子発芽過程に糖および脂質がどのように代謝されているのか調査した。付着器形成した場合には、胞子に蓄えられていた糖・脂質は発芽菌糸・付着器へと転送され、胞子内部にはほとんど残存しなかった。付着器が成熟した頃には付着器からも陽性シグナルはほとんど消失した。これには付着器が成熟する過程でメラニン化が発達し、染色液が付着器内部へ浸透しないことも要因の一つとして考えられた。

一方、付着器を形成しない条件においては、胞子において糖・脂質が残存しているのが確認された。また、この代謝変動は、オートファジーの活性状況と相関が認められた。すなわち、

付着器形成時においては、胞子における核のほとんどが分解されたのに対して、付着器が形成されていない条件においては、胞子細胞の核は正常に保たれたままであった。

4) 新たな知見

本研究を実施している過程において、これまで付着器を形成する条件として利用していたカバーガラスについて、付着器形成率が安定しない事象が散見された。不安定な要因として、滴下した胞子懸濁液が形成するドームの計上が扁平になる傾向があったことより、カバーガラス表面の疎水性が低下したことにより付着器形成も低下したのではないかと考えた。そこで、カバーガラスの表面修飾を行い、付着器形成がどの程度変化するのかを調査した。カバーガラス表面を化学処理を施して親水性に修飾したところ、付着器形成は認められなくなった。その一方で、化学処理を施して疎水性に修飾したところ、同様に付着器形成はほとんど認められなかった。その一方で、カバーガラスを丁寧に洗浄処理を加え、親水性にしたところ、付着器が形成された。このことは、単純な疎水性・親水性で付着器形成が決定されているのではないという事が明らかとされた。基板表面の修飾技術を導入することで、物理的・化学的な環境を変化させることができるようになったので、今後、いもち病菌の付着器形成要因について、新たな研究フィールドを見出すことができた。

また、様々な基質にいもち病菌を接種して核の分解様式を評価する過程において、付着器を形成しているにも関わらず、核の分解が生じない現象が見出された。特に、タマネギ表皮に接種した際に、核の分解は大幅に抑制された(図5)。この現象が植物侵入の際に共通して起きるのかを確認するために、イネ葉鞘裏面細胞およびオオムギ表皮細胞を用いて観察したところ、いずれにおいても付着器は形成されており、核の分解程度はカバーガラスと比べると減少したが、タマネギ表皮と比べると分解されている胞子が多かった。このことは、付着器形成において必ずしもオートファジーに伴う核の分解が起こらないことを示している。植物由来成分は胞子の核分解を抑制する効果を有しているものがあり、その一つとして、タマネギ由来のケルセチンが挙げられた。ケルセチンを投与すると濃度依存的に核の分解が抑制された。そこで、オオムギ表皮にタマネギ表皮浸出液を添加していもち病菌胞子を接種したところ、タマネギ表皮浸出液無添加区と核の分解程度は変わらなかった。イネやオオムギ表皮細胞ではケルセチンなどの胞子分解抑制効果はキャンセルされたことより、表皮に存在するクチンモノマーなどの化学物質の存在が核の分解を促進している可能性が示唆された。しかし、タマネギ表皮において、付着器から高い頻度でタマネギ表皮細胞に侵入していることが確認されたことより、オートファジーによる核分解は宿主侵入能力に大きな影響を及ぼさないことを示している。

以上の発見は、いもち病菌の宿主侵入過程において、付着器形成シグナル伝達機構、糖・脂質代謝機構、オートファジー機構が密接に関連していることを示唆しており、それらを明らかにすることで、病原性発現に重要な鍵因子を明らかとすることが期待される。

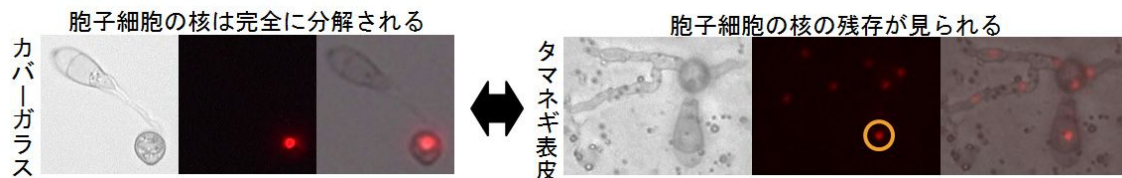


図5 . いもち病菌の異なる基質上における胞子の核の分解様式

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Xiang Zikai, Okada Daiki, Asuke Soichiro, Nakayashiki Hitoshi, Ikeda Kenichi | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Novel insights into host specificity of <i>Pyricularia oryzae</i> and <i>Pyricularia grisea</i> in the infection of gramineous plant roots | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology | 6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1670 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.13259 | 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 Minh Dang Ngoc, Tsukahara Yusaku, Thach Dang An, Ikeda Ken-ich, Nakayashiki Hitoshi | 4. 巻 89 |
| 2. 論文標題 MoSET1-dependent transcription factors regulate different stages of infection-related morphogenesis in <i>Pyricularia oryzae</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology | 6. 最初と最後の頁 77 ~ 83 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-022-01111-3 | 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19件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 向子愷, 岡田大樹, 中屋敷均, 池田健一 |
| 2. 発表標題 いもち病菌の根への感染機構の解明（1）各種病原型菌株を接種したイネ科植物の反応特性 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 小林奈月, 池田健一, 中屋敷均 |
| 2. 発表標題 ヒストン修飾から見たイネ科植物いもち病菌のゲノム進化 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 楊鈞皓, 向子愷, 中屋敷均, 池田健一 |
| 2. 発表標題 いもち病菌の病原性発現過程における糖代謝と脂質代謝のクロストーク |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西西部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 内橋嘉一, 池田健一, 奥田樹, 川口藍乃, 松本純一, 足助聡一郎, 神頭武嗣, 土佐幸雄 |
| 2. 発表標題 コムギいもち病菌に対するベノミルの抑制効果 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西西部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西村文宏, 森脇丈治, 池田健一, 森充隆 |
| 2. 発表標題 <i>Alternaria brassicicola</i> のnit変異菌株の作製とその性状 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西西部会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田健一 |
| 2. 発表標題 植物 - 微生物間相互作用解析における電子顕微鏡技術 |
| 3. 学会等名 第19回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林奈月, Thach Dang, 池田健一, 中屋敷均 |
| 2. 発表標題 いもち病菌のゲノム進化における遺伝子水平移行のインパクト |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林奈月, Thach Dang, Kieu Pham, 池田健一, 中屋敷均 |
| 2. 発表標題 イネ科植物いもち病菌における抑制的ヒストン修飾H3K9me3とH3K27me3による遺伝子発現制御 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 柏木結, 吉村優, 森垣憲一, 中屋敷均, 池田健一 日本植物病理学会大会 2022年3月28日 |
| 2. 発表標題 人工基質表面特性がいもち病菌の胞子発芽に与える影響 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 向子愷, 中屋敷均, 池田健一 |
| 2. 発表標題 イネ根へのいもち病菌の感染において品種特異的抵抗性は機能しない |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田健一, 内橋嘉一, 川口藍乃, 中屋敷均, 土佐幸雄 |
| 2. 発表標題 コムギいもち病菌における定量PCR法及びLAMP法による検出用プライマーの検討 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Thach An Dang;Yusaku Tsukahara;Minh Ngoc Dang;Kenichi Ikeda;Hitoshi Nakayashiki |
| 2. 発表標題 Functional characterization of MoSET1-dependent transcription factors in <i>Pyricularia oryzae</i> |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田健一, 内橋嘉一, 奥田樹, 中屋敷均, 土佐幸雄 |
| 2. 発表標題 コムギいもち病菌における新規特異的検出用qPCR/LAMPプライマーの設計 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 An Thach Dang, Ngoc Minh Dang, Kenichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki |
| 2. 発表標題 MoSet1-dependent Zn2/Cys6 transcription factor plays a role in physical signal-triggered appressorium formation |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林奈月, Thi Minh Kieu Pham, 池田健一, 中屋敷均 |
| 2. 発表標題 イネ科植物いもち病菌における抑制的ヒストン修飾H3K9me3とH3K27me3の相互作用 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 内橋嘉一, 池田健一, 川口藍乃, 松本純一, 森田耕平, 足助聡一郎, 神頭武嗣, 土佐幸雄 |
| 2. 発表標題 コムギいもち病菌に対するペフラゾエート及びイブコナゾールの抑制効果 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田健一, 内橋嘉一, 奥田樹, 中屋敷均, 土佐幸雄 |
| 2. 発表標題 コムギ穂の登熟過程におけるいもち病菌の感染時期が種子汚染頻度に与える影響 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 向子愷, 鶴嶋鉄, 中屋敷均, 池田健一 |
| 2. 発表標題 いもち病菌の根への感染機構の解明(2)メヒシバいもち病菌によるイネ根の生長抑制と黒変症状の要因解析 |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 An Thach Dang, Ngoc Minh Dang, Yusaku Tsukahara, Kenichi Ikeda, Hitoshi Nakayashiki |
| 2. 発表標題 A MoSet1-dependent Zn2/Cys6 transcription factor regulates appressorium formation through cation movement in Pyricularia oryzae |
| 3. 学会等名 日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
| | |