

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15500

研究課題名（和文）植物病原系状菌の病原性に寄与する二次代謝物の同定と機能解明

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of secondary metabolites contributing to pathogenicity of phytopathogenic fungi

研究代表者

熊倉 直祐（Kumakura, Naoyoshi）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：50815438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物病原系状菌は植物への感染時に多数の二次代謝物生合成酵素遺伝子の発現を上昇させることから、二次代謝物を用いて感染を成立させることが予測されている。しかしながら植物病原系状菌が感染時に分泌する二次代謝物とその作用は、ごく一部を除きほとんど明らかになっていなかった。本研究では植物病原系状菌であるイネいもち病菌および炭疽病菌において病原性に寄与する新たな二次代謝物生合成酵素遺伝子を同定した。この遺伝子の生産物とその機能を明らかにすれば、植物病原系状菌感染の分子メカニズムの一端を明らかにすることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病害の原因の約八割を占めると推定される植物病原系状菌対策は食料安全保障を確保する上で重要な課題である。本研究では植物病原系状菌感染の分子メカニズムを明らかにする基礎研究を通じて、病害対策に貢献することを目的とした。これまでに作物被害額の大きなイネいもち病菌や炭疽病菌に保存され、感染に必須な二次代謝物生合成遺伝子を同定した。本遺伝子の生産物を同定しその機能を解明すれば、感染の未知の分子メカニズムを明らかにすることができる。さらに同定した遺伝子を標的とした阻害剤を開発すれば、感染のみを阻害する殺菌剤ではない低環境負荷の農薬開発に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：Phytopathogenic fungi are predicted to use secondary metabolites (SMs) to establish infection since they up-regulate the expression of a number of genes encoding SM biosynthetic enzymes during the infection of plants. However, SMs synthesized by phytopathogenic fungi during infection and their actions have been largely unknown except in a few cases. In this study, we identified new secondary metabolite biosynthetic enzyme genes that contribute to pathogenicity in the phytopathogenic fungi, *Magnaporthe oryzae* and *Colletotrichum* spp.. Identification of SMs synthesized by these genes and their functions will provide insights into molecular mechanisms of infection by phytopathogenic fungi.

研究分野：微生物学、植物病理学

キーワード：二次代謝物 植物病原系状菌 炭疽病菌 イネいもち病菌

## 1. 研究開始当初の背景

世界中で甚大な作物被害をもたらす植物病原系状菌は基礎・応用の両面で重要な研究対象である。植物病原系状菌は植物への感染時に多数の二次代謝物生合成酵素遺伝子の発現を上昇させることから、二次代謝物を用いて感染を成立させることが予測されている。しかしながら植物病原系状菌が感染時に分泌する二次代謝物とその作用は、ごく一部を除きほとんど明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究のは植物病原系状菌の病原性に寄与する二次代謝物生合成遺伝子の同定とその機能解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

研究の遂行にあたり、主に以下の3つの技術・手法を用いた。

(1) ゲノム・トランスクリプトーム解析により、植物病原系状菌の二次代謝物生合成遺伝子を予測し、さらにその中から病原性に寄与する遺伝子を予測した。

(2) 自ら開発した高効率遺伝子破壊法を用い、上記で予測した遺伝子の単独・多重破壊株を作出し、病原性の低下を指標に病原性に寄与する遺伝子を同定した。

(3) 同定した二次代謝物生合成遺伝子について、異種発現系を用い、生産物の同定を試みた。

## 4. 研究成果

まず、ゲノム解析により植物病原系状菌の一種である炭疽病菌において、二次代謝物生合成に寄与する遺伝子を予測し、73個の二次代謝物生合成鍵遺伝子 (Secondary metabolite synthesis key genes) を同定した。一般的に微生物の二次代謝物生合成に寄与する遺伝子はゲノム上の同一領域でクラスターを形成する。そこで、炭疽病菌ゲノムにおいて二次代謝物生合成遺伝子クラスターを予測し、58個の候補遺伝子クラスターを同定した。さらに炭疽病菌の病原性に寄与する遺伝子を同定するため、感染時に発現が誘導される遺伝子をトランスクリプトーム解析により探索した結果、23個のSMKGの発現が感染時特異的に上昇することを見出した。

炭疽病菌において自ら開発したCRISPR-Cas9を用いた高効率遺伝子破壊法を用い、感染時に発現が上昇する4個をSMKGを破壊した。SMKG破壊株の病原性を確認したところ、一つのSMKGにおいて、病原性を喪失することを確認した (SMKG1)。SMKG1は23個の遺伝子からなる遺伝子クラスターを形成することが予測されていたため、これらの遺伝子の破壊株を作出し、病原性試験により、SMKG1と同様に病原性が喪失する二次代謝物修飾酵素遺伝子 (Modifying enzyme1: ME1) を同定した。SMKG1とME1は同一の二次代謝物の生合成を通じて病原性に寄与することが予想された。

SMKG1 と ME1 の生産物の同定を、これらの遺伝子を異なる細胞種で強制発現させる異所発現系を用いて試みた。フランス INRAE の研究者との共同研究により、酵母を用いた異所発現系を用い、SMKG1 と ME1 の強制発現株を作出した。強制発現株とコントロール株を異なる複数の培養条件下で培養し、代謝物を抽出し、HPLC 解析を実施した。これまでのところ、ある条件下で強制発現株でのみみられる HPLC のピークを同定した。現在このピークの再現性を確認している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gan Pamela, Hiroyama Ryoko, Tsushima Ayako, Masuda Sachiko, Shibata Arisa, Ueno Akiko, Kumakura Naoyoshi, Narusaka Mari, Hoat Trinh Xuan, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Telomeres and a repeat rich chromosome encode effector gene clusters in plant pathogenic Colletotrichum fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15490	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 Chen Jinlian, Inoue Yoshihiro, Kumakura Naoyoshi, Mise Kazuyuki, Shirasu Ken, Takano Yoshitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparative transient expression analyses on two conserved effectors of Colletotrichum orbiculare reveal their distinct cell death inducing activities between Nicotiana benthamiana and melon	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13078	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 Tsushima Ayako, Narusaka Mari, Gan Pamela, Kumakura Naoyoshi, Hiroyama Ryoko, Kato Naoki, Takahashi Shunji, Takano Yoshitaka, Narusaka Yoshihiro, Shirasu Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 The Conserved Colletotrichum spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.682155	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 Kumakura Naoyoshi, Singkaravanit-Ogawa Suthitar, Gan Pamela, Tsushima Ayako, Ishihama Nobuaki, Watanabe Shunsuke, Seo Mitsunori, Iwasaki Shintaro, Narusaka Mari, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.10.13.464185	査読の有無 無
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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 熊倉直祐, 米原克磨, Pamela Gan, 石濱伸明, 白須賢
2. 発表標題 植物病原糸状菌における病原性に寄与する二次代謝物生合成酵素遺伝子の多重遺伝子破壊法を用いた同定
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊倉直祐, Pamela Gan, 米原克磨, 白須賢
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌およびアブラナ科炭疽病菌の二次代謝物生合成酵素遺伝子PKS13は宿主植物葉への侵入に必要である
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Nobuaki Ishihama, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Shintaro Iwasaki, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu
2. 発表標題 Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊倉直祐, Mingming Chen, Ryan Muller, 七野悠一, 西本まどか, 水戸麻理, Pamela Gan, Nicholas T. Ingolia, 白須賢, 伊藤拓宏, 岩崎信太郎
2. 発表標題 Rocaglateを生合成するアグラリア属植物に寄生する糸状菌は変異型eIF4Aを利用して生存する
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米原克磨、熊倉直祐、Pamela Gan、白須賢
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌感染における殺生段階成立に必要な病原性因子の探索
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura
2. 発表標題 Identification of secondary metabolite synthesis genes involved in virulence of Colletotrichum fungi using a multiplex gene disruption system
3. 学会等名 Seminar at BIOGER in INRAE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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