

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14857

研究課題名(和文) タマネギ乾腐病菌のSIX3エフェクターの盤茎における局在解析

研究課題名(英文) Localization analysis of SIX3 effector in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

研究代表者

佐々木 一紀 (Sasaki, Kazunori)

山口大学・大学研究推進機構 ・准教授

研究者番号：50766318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タマネギの盤茎部に焦点を当て、タマネギ乾腐病菌のエフェクターであるFocSIX3およびFocSIX5の宿主内局在とその機能を明らかにすることを目的とした。感受性のタマネギ盤茎部において、FocSIX3とFocSIX5はアポプラスト領域に局在し、抵抗性のシャロットではしていなかったことから、これらの盤茎部のアポプラスト領域での共局在が病原性に関与していることが示唆された。また、FocSIX5がシャロットに対する非病原力遺伝子として働くことを明らかにした。シャロットにおけるFocSIX5受容体候補遺伝子を選抜しており、タマネギ乾腐病耐病性育種への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タマネギ乾腐病は、世界中で発生しているタマネギの重要病害であるが、その感染メカニズムは未解明の部分が多く、完全な耐病性品種も存在しない。本研究により得られた知見は、タマネギ乾腐病菌の感染メカニズム解明の一端を担うものであるとともに、非病原力遺伝子を標的としたタマネギ乾腐病耐病性育種への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish the functions and host localizations of FocSIX3 and FocSIX5 effector in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. FocSIX3 and FocSIX5 were localized to the apoplastic region in basal plate of susceptible onion plants, but not that in resistant shallots, suggesting that their co-localization in apoplastic region of basal plate is involved in their pathogenicity. In addition, this study revealed that FocSIX5 acts as an avirulence gene against shallots. FocSIX5-receptor candidate genes in shallot were selected, which is expected to be applied to resistance breeding for onion basal rot disease.

研究分野：植物病理学

キーワード：タマネギ乾腐病 エフェクター シャロット フザリウム

1. 研究開始当初の背景

近年、夏季の気温の高温化やゲリラ豪雨の頻発にともない、北海道などの日本の主要タマネギ産地においてタマネギ乾腐病が多発するようになり、経済的に大きな被害をもたらしている。タマネギ乾腐病は土壌伝染性病原菌である *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* によって引き起こされるが、その感染メカニズムや病原性遺伝子などに関する研究報告は国内外問わず 2010 年代までほとんどなかった。また、タマネギ乾腐病に対する完全な抵抗性品種はなく、その育種が求められている。

これまでの研究において、タマネギ乾腐病菌のエフェクターである FocSIX3 は、タマネギに対する病原性因子として働いていることを見出した。さらに、FocSIX3 タンパク質は、感染したタマネギの盤茎部および根で発現しているが、特に盤茎部でより多く蓄積していることから、タマネギ盤茎部はタマネギ乾腐病菌の感染、さらには FocSIX3 の機能において重要な部位であることが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タマネギの盤茎部に焦点を当て、タマネギ乾腐病菌の感染動態を明らかにするとともに、タマネギ乾腐病菌のエフェクター FocSIX3 の細胞内局在とその機能を明らかにすることである。具体的には、タマネギ乾腐病菌の盤茎部での所在を顕微鏡観察によって解析し、免疫染色法を用いて FocSIX3 および FocSIX5 タンパク質の盤茎細胞内での局在に関する知見を得る。また、FocSIX3 および FocSIX5 遺伝子破壊株を宿主に接種することで、それらの宿主感染時における機能解明につながる知見を得る。

3. 研究の方法

(1) タマネギ乾腐病菌の宿主盤茎内での局在観察

タマネギ乾腐病菌を感受性のタマネギおよび抵抗性のシャロットに接種することで、その細胞内局在を観察した。接種して 1, 2, 3 週間後の盤茎をサンプリングして、固定、パラフィン包埋を行った。切片を作製し、顕微鏡による観察を行った。

(2) 宿主盤茎内での FocSIX3 および FocSIX5 の局在解析

接種して 1, 2, 3 週間後の盤茎切片に対して、抗 SIX3 及び抗 SIX5 抗体を用いた免疫染色を実施し、タマネギおよびシャロットの盤茎部における SIX3 及び SIX5 の局在を調査した。

(3) シャロットに対する非病原力因子の特定

FocSIX3 および FocSIX5 遺伝子破壊株を作製し、感受性タマネギおよび抵抗性シャロットに対して接種試験を行った。さらに、FocSIX5 については相補株を作製し、接種を行った。

(4) FocSIX5 に対する受容体の探索

シャロットで FocSIX5 の受容体として働く遺伝子を探索するために、野生株および FocSIX5 破壊株を接種したシャロットの RNA-seq を行った。発現変動した受容体様遺伝子については、FocSIX5 との Yeast-two hybrid を行い、相互作用を検証した。

4. 研究成果

(1) タマネギ乾腐病菌の宿主盤茎内での局在観察

タマネギ盤茎部におけるタマネギ乾腐病菌の局在を調べたところ、接種 3 週間後のアポプラスト領域に、タマネギ乾腐病菌の菌糸および胞子を観察できた (図 1)。一方でタマネギ乾腐病菌に対して抵抗性を示すシャロット盤茎内では、タマネギ乾腐病菌の存在は確認できなかった。

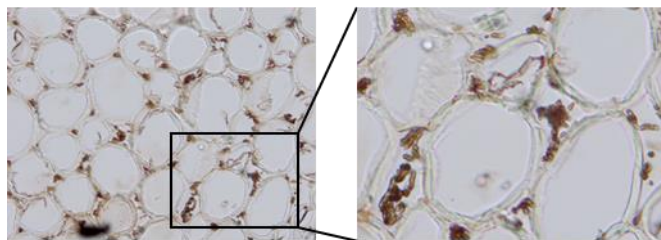


図 1. タマネギ盤茎部内でのタマネギ乾腐病菌

(2) タマネギ盤茎内での FocSIX3 および FocSIX5 の局在解析

抗 SIX3 及び抗 SIX5 抗体を用いた免疫染色を実施し、タマネギおよびシャロットの盤茎部における FocSIX3 及び FocSIX5 の局在を調査した。免疫染色の結果、FocSIX3 および FocSIX5 は乾腐病感受性タマネギの盤茎部における維管束部およびアポプラスト領域に局在していた(図2)。一方、抵抗性シャロットにおいては、接種3週間後の維管束部においてのみ FocSIX3 および FocSIX5 の局在が共に観察された(図3)。

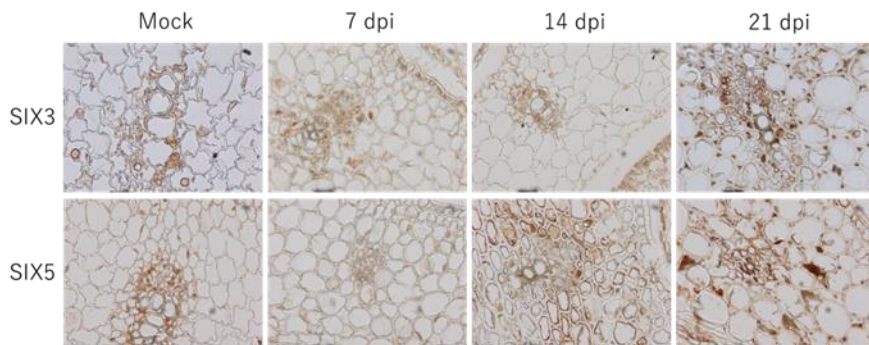


図2. タマネギ盤茎における抗SIX3および抗SIX5抗体を用いた免疫染色

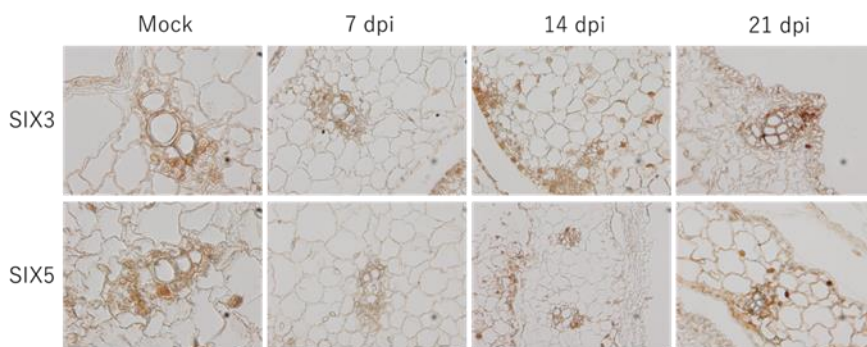


図3. シャロット盤茎における抗SIX3および抗SIX5抗体を用いた免疫染色

トマト萎凋病菌において、SIX3 と SIX5 遺伝子はプロモーターを共有しており、トマト内で相互作用することが明らかになっている。そこで、タマネギ乾腐病菌の FocSIX3 と FocSIX5 も相互作用しているか調べるために、Yeast-two hybrid 法を行ったところ、酵母内において両タンパク質は相互作用していることが明らかになった(図4)。以上の結果から、FocSIX3 及び FocSIX5 のアポプラスト領域への共局在が、感受性をもつタマネギで観察され、抵抗性のシャロットではみられなかったことは、FocSIX3 及び FocSIX5 は盤茎部のアポプラスト領域に共局在することで病原性に寄与している可能性がある。

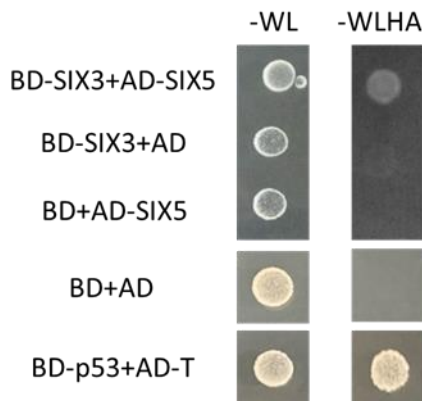


図4. FocSIX3とFocSIX5の相互作用解析

(3) シャロットに対する非病原力因子の特定および受容体の探索

抵抗性を有するシャロットに対するタマネギ乾腐病菌の非病原力遺伝子を明らかにするために、FocSIX3 および FocSIX5 遺伝子破壊株を作製し、シャロットに対して接種試験を行った。その結果、タマネギ乾腐病菌の野生株および FocSIX3 破壊株を接種したシャロットは無病徴であったのに対して、FocSIX5 破壊株を接種したシャロットは激しい萎凋症状を示した。さらに、FocSIX5 遺伝子破壊株をもとに相補株を作製し接種を試みたところ、シャロットは野生型を接種した時と同様に病徴が見られなかった。このことから、FocSIX5 はシャロットに対する非病原力因子として働くことを見出した(図5)。

(4) FocSIX5 に対する受容体の探索

シャロットで FocSIX5 の受容体として働く遺伝子を探索するために、野生株および FocSIX5 破壊株を接種したシャロットの RNA-seq を行った。その結果、FocSIX5 破壊株を接種したシャロットで発現が上昇していた SIX5 受容体候補遺伝子を 51 個見出した。今後これら候補遺伝子と SIX5 の直接的な相互作用を解析する研究を行うべきと考える。

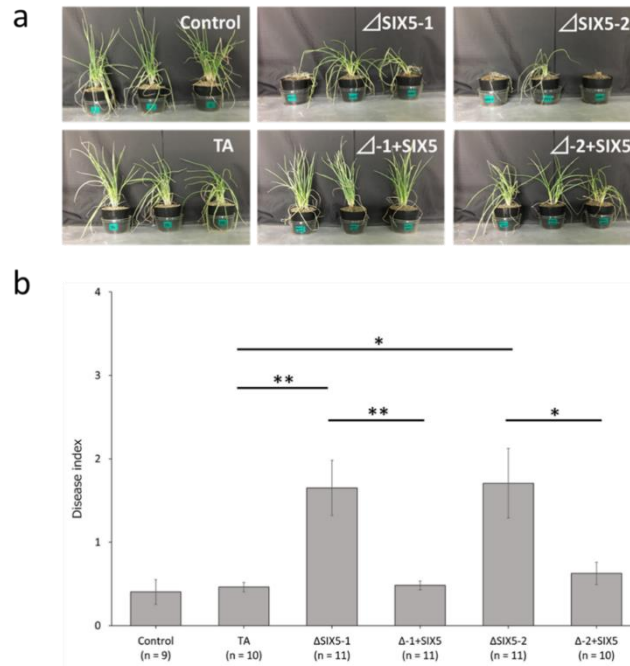


図 5. FocSIX5 遺伝子破壊株および相補株のシャロットに対する接種試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakane Kosei, Akiyama Mitsunori, Ando Ayaka, Shigyo Masayoshi, Ito Shin-ichi, Sasaki Kazunori	4. 巻 123
2. 論文標題 Identification of a novel effector gene and its functional tradeoff in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> that infects Welsh onion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological and Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 101939 ~ 101939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmpp.2022.101939	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 Watanabe Akihiro, Miura Yuto, Sakane Kosei, Ito Shin-ichi, Sasaki Kazunori	4. 巻 89
2. 論文標題 Identification and characterization of <i>Fusarium commune</i> , a causal agent of lotus rhizome rot	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-023-01119-3	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 Sakane Kosei, Kunimoto Masaaki, Furumoto Kazuki, Shigyo Masayoshi, Sasaki Kazunori, Ito Shin-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 The SIX5 Protein in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> Acts as an Avirulence Effector toward Shallot (<i>Allium cepa</i> L. <i>Aggregatum</i> Group)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2861 ~ 2861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms11122861	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 Sakane Kosei, Akiyama Mitsunori, Jogaiyah Sudisha, Ito Shin-ichi, Sasaki Kazunori	4. 巻 170
2. 論文標題 Pathogenicity chromosome of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fungal Genetics and Biology	6. 最初と最後の頁 103860 ~ 103860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fgb.2023.103860	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

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂根光星, 伊藤真一, 佐々木一紀
2. 発表標題 Fusarium oxysporum f. sp. cepaeにおける非病原力遺伝子
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂根光星, Nilar Myint, 伊藤真一, 佐々木一紀
2. 発表標題 Fusarium oxysporum f. sp. cepaeにおける病原性染色体の同定
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nilar Myint, Kosei Sakane, Shin-ichi Ito, Kazunori Sasaki
2. 発表標題 Identification and characterization of Fusarium species, causal agent of Fusarium basal rot disease on onion in Myanmar
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木一紀, 安部弥生, 執行正義, 伊藤真一
2. 発表標題 CRISPR/Cas9タンパク質を用いたタマネギ乾腐病菌の遺伝子破壊法の検討
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosei Sakane, Shin-ichi Ito, Kazunori Sasaki
2. 発表標題 Identification of a pathogenicity chromosome in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>
3. 学会等名 12th International Congress of Plant Pathology (ICPP2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazunori Sasaki, Yuta Funahashi, Kosei Sakane, Shin-ichi Ito
2. 発表標題 Function and host cell localization of SIX3 and SIX5 effectors in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>
3. 学会等名 12th International Congress of Plant Pathology (ICPP2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nilar Myint, Kosei Sakane, Shin-ichi Ito, Kazunori Sasaki
2. 発表標題 Management of fusarium basal rot disease caused by <i>Fusarium acutatum</i> , isolated from onion production field in Myanmar
3. 学会等名 令和 5 年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船橋佑太, 坂根光星, 伊藤真一, 佐々木一紀
2. 発表標題 タマネギ乾腐病菌が分泌するエフェクター-SIX3およびSIX5の宿主細胞内局在
3. 学会等名 令和 5 年度日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂根光星, 船橋佑太, Nilar Myint, 伊藤真一, 佐々木一紀
2. 発表標題 ネギ萎凋病菌におけるエフェクター遺伝子Cep28の同定
3. 学会等名 令和 5 年度日本植物病理学会関西西部会
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		
インド	Central University of Kerala		