様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：１２７０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ１９１１０

研究課題名（和文）一過性発現法を用いた希少さび病菌由来エフェクター候補遺伝子の探索

研究課題名（英文）Search for candidate effector genes derived from rare rust fungi using transient expression system

研究代表者
平塚　和之（Hiratsuka, Kazuyuki）

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：３０２０２２７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：さび病菌のゲノム情報から核移行配列やDNA結合モチーフ等を目安としてエフェクター候補遺伝子の配列情報を収集し、それらをアグロバクテリウムを用いた一過性発現系を用いて機能解析を試みることを目的とした。具体的には、比較的十分量の菌体が得られるメダケ赤衣病菌を用いて、その菌体破砕方法等について検討し、有効な菌体破砕方法を見いだした。
アグロバクテリウムを用いた一過性発現系に関しては、マルチウェルプレートとシロイヌナズナ芽生えを用いるハイスループット系を確立し、その系を用いて、遺伝子導入発現効率を向上させる低分子化合物の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
さび病菌の新規エフェクターの同定には至らなかったが、同時並行して実施した、新規な一過性発現系に関する研究は順調に進み、マルチウェルプレートとシロイヌナズナ芽生えを用いたハイスループット系を確立することが出来た。さらに、一過性発現系を高効率化する新規な生理活性物質を発見したが、これは植物を用いた有用物質生産系の高効率化等の応用が考えられ、今後の産業応用が大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to collect information on effector candidate gene sequences from the genome information of rust fungi, based on nuclear localization sequences and DNA binding motifs as a marker, and to analyze their functions using a transient expression system with Agrobacterium. I investigated the method of disruption of the rust fungal spores , and found an effective method of disruption of the fungal spores.
To establish transient expression assay system using Agrobacterium, I established a high-throughput system using multi-well plates and Arabidopsis seedlings, and succeeded in obtaining synthetic compounds that improve the efficiency of transgene expression using this system.

研究分野：応用分子細胞生物学、植物病理学

キーワード：さび病菌　エフェクター　一過性遺伝子発現　アグロバクテリウム　生理活性物質

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

高等植物細胞を対象とした一過性発現による遺伝子導入発現は、プロトプラスト法をはじめとして多岐にわたるが、申請者らは遺伝子銃を用いる方法に関してその黎明期より取り組み、それを長年使用してきた。一方、アグロバクテリウム法を用いる方法が近年は汎用的手法として一過性遺伝子導入方法として普及し活用され、それらを応用・駆使した遺伝子機能解析に注目した。また、次世代シーケンサー技術の普及と、ゲノム情報解析手法の急速な進展による in silico での遺伝子機能解析技術の導入に期待が持たれる状況にあった。一方で、さび病菌は事実上人工培養は不可能であり、他の重要植物病原菌群とは異なるアプローチが必要であり、その一環として上記の一過性遺伝子導入系とゲノム解析技術を融合させた研究を着想するに至った。さび病菌ゲノム DNA に関する研究に関しては、申請者らは先行研究を実施しており、ある程度の技術的問題点等に関する知見はあったことも研究開始の背景として重要であった。

２．研究の目的

一過性発現系による高等植物細胞を利用した遺伝子機能解析系を確立し、植物病原菌由来のエフェクター候補遺伝子の機能解析に用い、新規な有用遺伝子を希少さび病菌から見いだすことを最終目的とする。
一方、希少さび病菌試料の保存と整理にも配慮し、遺伝子資源として今後の永続的な利用についての知見も得る。

３．研究の方法

一過性導入系の改良と高効率化についても様々なレポーター系と導入系について検討し、従来から用いている遺伝子銃の系に加え、アグロバクテリウム法によるマルチウェルプレートとシロイヌナズナ芽生えを用いたハイスループット系の高効率化について検討する。さらに *Nicotiana benthamiana* の成熟葉を用いたアグロインフィルトレーション法の系については集中的に試行実験を行う。
希少さび病菌サンプルからゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる塩基配列決定を実施、得られたゲノム情報を解析して、DNA 結合ドメインあるいは核移行シグナルを指標とした網羅的探索を実施する。次にそれらの配列情報に基づいて PCR 法により、それらの機能ドメインを GFP と融合させ、核移行能について検討し、また GAL4 系を用いた転写活性化・抑制能についても調べる。機能ドメインの解析系としては Crispr-Cas9 系の応用版である dCAS9 融合タンパクの使用についても検討し、特に転写活性化・抑制ドメインの評価への応用を試みる。

４．研究成果

一過性発現系に関する研究
遺伝子銃の系では、１回の導入で６サンプルを独立に導入可能なフォルダーを新たに用いる系を試行し、pUC 系のコンパクトな遺伝子ベクターに挿入した DNA 試料を用いる実験系において、核移行シグナルの検証等に効率的に用いることが出来ることを明らかにした。
一方、アグロバクテリウム法によるシロイヌナズナ芽生えへの遺伝子導入に関しては、イントロン挿入型のルシフェラーゼレポーターをもちいる遺伝子発現モニタリング系の改良に取り組み、特に化合物ライブラリーからバイオスティミュラントとして遺伝子発現導入を促進する生理活性を有する新規な化合物の探索を実施し、既存のジャスモン酸メチルアゴニストとは異なる新規化合物を複数同定した。また、機能ドメインのアッセイ系として GAL4 系に加え、dCAS9 系の使用について検討し、転写活性化ドメインの評価に使用可能であることを明らかにした。GAL4 系では標的配列が UAS 配列に限定されるが、dCAS9 系を用いることにより、シロイヌナズナまたは *N. benthamiana* の任意のゲノム配列や、植物由来プロモーターを標的とする配列を使用することが可能となり、機能解析の選択肢が大きく広がった。この方法を用いることにより、たとえば任意の植物ホルモン応答性遺伝子に対する作用を確認する実験等が考えられる。

希少さび病菌ゲノム DNA に関する研究

希少さび病菌からの DNA 抽出に関しては、一貫してメダケ赤衣病菌の冬胞子堆を用いて抽出効率と、得られた DNA の品質に関する調査を行った。その結果、抽出効率と作業効率を優先した場合はガラスホモジナイザーか、モーター駆動型のプラスチックペッスルを用いる方法が明らかに優れていたが、得られた DNA の断片化が不可避であった。そこで、今回はシリコンコートしたスライドガラスに挟み込む方法を試行し、概ね 20kb 以上のゲノム DNA が得られるという知見を得た。この方法では作業効率はかなり劣るが、希少さび病菌の供試サンプルが限られる状況を考慮すると、ゲノム情報解析においても有効であると考えられた。全ゲノム情報を得るという当初の計画は完遂できていないが、良好な DNA サンプル獲得のノウハウは蓄積できた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

1．著者名 Nakamura Tetsutaro、Osawa Yukiko、Ogura Rieko、Hiratsuka Kazuyuki	4．巻 41
2．論文標題 Suppression of defense gene expression under nutrient-rich condition in Arabidopsis seedlings	5．発行年 2024年
3．雑誌名 Plant Biotechnology	6．最初と最後の頁 479～483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.24.0726a	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0件

〔図書〕　計1件

1．著者名 発光レポーターを利用したバイオスティミュラントの探索・評価系	4．発行年 2024年
2．出版社 シーエムシー出版	5．総ページ数 288
3．書名 バイオスティミュラントの開発動向と展望	

〔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