

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：24201

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14895

研究課題名（和文）植物病原菌の病原性に関与するプログラム細胞死機構の解明

研究課題名（英文）Study of the programmed cell death mechanism involved in pathogenicity of plant fungal pathogens

研究代表者

住田 卓也（SUMITA, Takuya）

滋賀県立大学・環境科学部・講師

研究者番号：90881136

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）：先行研究で、我々はウリ類炭疽病菌のユビキチンリガーゼ関連遺伝子CoGRR1の破壊株が胞子だけでなく、付着器（感染器官）においてもプログラム細胞死（PCD）を起こすことを見出してきた。本研究では、野生株と破壊株の菌糸体および付着器形成時の胞子発芽体を用いたRNA-Seq解析により、付着器形成時の破壊株で特異的に高発現している遺伝子群を同定した。これらの中にはPCDに関与する新規遺伝子が含まれている可能性がある。また、CoGRR1の部分欠損変異体を用いた相補試験により、CoGRR1を介したタンパク質分解が細胞死の制御に関与していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウリ類炭疽病菌・イネいもち病菌などの植物病原菌において、感染過程で起きる胞子のプログラム細胞死は感染の成立に重要と考えられているが、その機構には未解明な点が多い。本研究において得られたPCDへの関与が推測される遺伝子群の機能解析を進めることで、これらの重要病原菌の防除法や殺菌剤の開発に寄与することが期待できる。また真菌におけるPCDメカニズムに関する知見は哺乳動物と比較して未だ不十分であり、本研究の成果はその基礎的な理解の進展にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In our previous study, we have found that disruptants of the F-box gene CoGRR1 in *Colletotrichum orbiculare* caused a programmed cell death not only in conidia after appressorial formation but also in appressoria. In this study, we performed RNA-Seq analysis using mycelia and conidial germlings that developed appressoria of the wild-type and the disruptant. We identified a group of genes that were specifically expressed in the conidial germlings of the disruptant that developed appressoria. It is possible these include novel genes involved in the machinery of the PCD. In addition, the complementation analysis using CoGRR1 lacking F-box domain suggested that selective protein degradation via CoGRR1 regulate a process of the PCD.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 付着器 プログラム細胞死 ユビキチン・プロテアソーム系

## 1. 研究開始当初の背景

多くの植物病原菌は孢子から分化する器官「付着器」を用いて植物に侵入する。モデル病原菌の一つイネいもち病菌では、付着器分化後に孢子でオートファジーによる内容物の分解および細胞の自殺が起き、この過程が侵入に必要であるとされている。しかし、このプログラム細胞死(PCD)を制御し実行するメカニズムには未解明の部分が多い。研究代表者は同様の細胞死現象が認められるウリ類炭疽病菌において、タンパク質をユビキチンで修飾し分解に導くユビキチンリガーゼ関連遺伝子 *CoGRR1* の破壊株が、孢子に続き付着器においても細胞死を引き起こし、病原性を失うことを見出した。この知見から、感染過程の PCD をタンパク質の選択的分解系が制御する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物病原菌の感染過程特異的な PCD の制御メカニズムとユビキチン・プロテアソーム系(UPS)によるタンパク質分解の関連性、そして PCD の実行メカニズムの解明を目指した。そこで、PCD に関連して *CoGRR1* を介して UPS で分解されるタンパク質の同定、PCD の制御・実行に関わる因子の同定、感染過程における PCD の特徴づけ、イネいもち病菌における相同遺伝子の機能解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) PCD に関連して *CoGRR1* を介して UPS で分解されるタンパク質の同定

酵母ツーハイブリッド法を用いて、*CoGRR1* をベイトとしてウリ類炭疽病菌の cDNA ライブラリーから相互作用するタンパク質の同定を試みた。*CoGRR1* と出芽酵母のリガーゼ複合体の結合による目的基質への影響を避けるため、結合に必要な F-box ドメインを欠損させた *CoGRR1* を用いた。

### (2) PCD の制御・実行に関わる因子の解明

RNA-Seq 解析により、ウリ類炭疽病菌の野生株と *CoGRR1* 破壊株の付着器分化後の遺伝子発現を比較し、発現レベルの著しく変化した遺伝子の同定を行った。また、細胞核を蛍光タンパク質融合遺伝子で標識した破壊株を親株としてアグロバクテリウム法によるランダム変異導入を行い、付着器の PCD が抑制される変異株の取得とタグ挿入位置の決定を試みた。

### (3) 感染過程における PCD の特徴づけ

感染過程の PCD メカニズムの理解を深めるため、ウリ類炭疽病菌の孢子および *CoGRR1* 破壊株の付着器の PCD の性質について各種細胞死阻害剤や細胞死検出試薬、細胞組織染色による解析を行った。

### (4) イネいもち病菌における相同遺伝子 *MoGRR1* の機能解析

これまでに、国外の研究例においてイネいもち病菌 *MoGRR1* の破壊株は孢子形成が顕著に低下することが示されており、*MoGRR1* の付着器の生存への関与は未解明であった。まず、国内で取得した分離株を親株として破壊株を作出し、解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) PCD に関連して *CoGRR1* を介して UPS で分解されるタンパク質の同定

ウリ類炭疽病菌の *CoGRR1* 破壊株に F-box ドメインの欠損型遺伝子を導入した菌株を作出し、付着器の生存性について解析したところ、破壊株と同様に細胞死が生じていた。このことから、*CoGRR1* がユビキチンリガーゼ複合体の一部として PCD の制御に必要であることが強く示唆された。続いてウリ類炭疽病菌の cDNA ライブラリーを構築し、酵母ツーハイブリッド法による *CoGRR1* の標的タンパク質の探索を行ったが、陽性クローンが得られなかったため、ライブラリーを再構築してスクリーニングを継続している。

### (2) PCD の制御・実行に関わる因子の解明

RNA-Seq により野生株と *CoGRR1* 破壊株の付着器分化後の遺伝子発現の比較解析を行い、破壊株で発現が 3 倍以上上昇・低下した遺伝子をそれぞれ 472 個・1402 個見出した。そのうち、破壊株で発現が 10 倍以上上昇しており、かつ破壊株の菌糸生育時と比べても 10 倍以上発現が上昇した遺伝子が 14 個含まれていた。これらの PCD との関連性を明らかにするため、今後詳細に調査を行う。アグロバクテリウム法による変異導入株についてはこれまでに約 540 株について

解析を行ったが、付着器の細胞死が抑制された変異株は得られていない。

(3) 感染過程における PCD の特徴づけ

ウリ類炭疽病菌の孢子および *CoGRR1* 破壊株の付着器における PCD と既知の PCD であるフェロトーチスおよびアポトーチスとの関連性の解析を行った。フェロトーチス阻害剤 CPX と Lip-1 による影響を調査したところ、一定濃度以上では形態形成への阻害作用が認められた。イネいもち病菌における報告とは異なり、通常の形態形成が可能な濃度においてこれら薬剤による PCD の阻害効果は認められなかった。また、アポトーチス検出試薬 FITC-VAD-fmk によって野生株の孢子および破壊株の付着器の細胞死を評価した。いずれの場合も過酸化水素処理によりアポトーチスを誘導した対照区と異なり、明確な蛍光は認められず、これらの PCD はカスパーゼ活性の上昇を伴わないことが示唆された。これらの結果から、ウリ類炭疽病菌の感染過程における PCD とフェロトーチスおよびアポトーチスの間に明確な関連性は認められず、未知の機構による可能性が考えられた。

(4) イネいもち病菌における相同遺伝子 *MoGRR1* の機能解析

国内分離株を親株としてイネいもち病菌の *MoGRR1* 遺伝子破壊株を作出し、一定の孢子形成が認められたため表現型解析を行った。破壊株は病原性が低下する傾向を示したが、形質が不安定であり、付着器の侵入能力・生存性について結論を導くに足るデータが得られなかった。現在、より形質の安定した別の国内分離株を親株に用いて破壊株の作出を再度進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------