

平成 31 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19267

研究課題名(和文)RIイメージングによる植物病原糸状菌における物質動態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of substance transfer between filamentous pathogens and host plants using RI imaging

研究代表者

吉田 健太郎 (Yoshida, Kentaro)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40570750

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)：絶対寄生菌であるコムギうどんこ病菌とその宿主植物であるパンコムギの相互作用における物質動態を明らかにすることを目的に、RIイメージング技術を用いて寄生菌から宿主へ、宿主から寄生菌への物質移行を可視化した。放射性同位体 ^{32}P と ^{14}C が、宿主植物からコムギうどんこ病菌に移行し、最終的に分生子に蓄積することを確認した。更に ^{32}P を含んだ分生子を第1葉に接種したところ、接種葉以外の植物部位に ^{32}P が移行した。このことは、未知の機構を介して病原菌由来の物質が植物体内を吸収され、移動することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原菌は、宿主植物の栄養を収奪し、この栄養を感染確立するためのエネルギー源もしくは、感染を可能にする物質を生産し、宿主植物に注入することによって植物に感染し、繁殖している。そのため、植物病原菌を防除するためには、植物病原菌と宿主植物の物質のやり取りを明らかにするための基礎研究が必要である。本研究は、植物病原菌の防除を実現するには、どのように宿主植物から栄養となる物質を吸収し、そして得られた物質を植物感染時に注入し、植物体内を可視化するための研究である。

研究成果の概要(英文)：To understand substance exchange between obligate biotroph, wheat powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, and its host plant, we visualized it using RI imaging technology. We confirmed the transfer of ^{14}C and ^{32}P from the host plant into the wheat powdery mildew and these substances were finally accumulated in conidia of the powdery mildew. The primary leaf of the host plant was inoculated with conidia labeled with ^{32}P , ^{32}P was detected in other parts of the host plant, indicating that phosphate from the powdery mildew was transferred into the epidermal cells and was moved into the other tissues of the host plant with unknown mechanisms.

研究分野：植物保護科学

キーワード：コムギ イネ うどんこ病菌 いもち病菌 放射性同位体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の吉田は、コムギうどんこ病菌とコムギの相互作用時における両者の遺伝子発現変動を RNA-seq によって網羅的に調べている。この研究の中で、日周変動する栄養吸収に関与する遺伝子や病原性に関与するエフェクター (病原菌から分泌し、植物の分子と相互作用し、病原性に寄与する分子) を同定した。しかしながら、これら遺伝子産物自身または関与する物質の宿主細胞内における動態を可視化しようにも、うどんこ病菌とコムギともに形質転換が困難であるため、細胞内局在で一般的に用いられている蛍光タンパク質による実験系を用いることができない。そこで、植物栄養学の分野で使われている RI イメージング技術を適用することで、上記の問題点を解決できるのではないかと考えた。また、研究分担者の井上は、栄養素の中で最も重要なうちの一つの炭素源に関わる糖代謝を、いもち病圃場抵抗性 *pi2l* 遺伝子が制御することを示唆する予備実験データを得ている。*pi2l* 遺伝子を持つ系統と持たない系統の両品種について、RI ラベルした物質を用いることで、いもち病斑への栄養の供給の実態を掴み、*pi2l* 遺伝子の物質代謝の制御を明らかにすることができると考えた。そこで、連携研究者である東京大学放射線植物生理学研究室の田野井、広瀬、杉田が確立した RI イメージング技術を植物-病原菌相互作用研究に適用させることで、宿主植物と病原菌との間の時間的・空間的物質動態を可視化し、遺伝子発現データの整合性と *pi2l* 遺伝子の物質代謝制御を検証することができるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RI イメージング技術を用いて、植物病原糸状菌と宿主植物における相互作用における物質動態を明らかにすることができる系を構築し、(1) 植物から病原糸状菌への物質動態、(2) 病原糸状菌から植物への物質動態を明らかにすることである。そこで、絶対寄生菌であるコムギうどんこ病菌とコムギの系と、イネとイネいもち病菌の系を用いてこれらの目的を達成する。宿主から吸収した物質は、病原糸状菌のどの組織に蓄積され、そして、病原糸状菌から宿主植物へ分泌された物質が、コムギの細胞内にどのように分布し、コムギのどの組織まで移行したのかを明らかにすることができる。そのために感染葉における RI イメージングの3次元化を目指し、絶対寄生菌から植物への物質動態を可視化する技術を開発する。RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析をおこなうことで、放射性同位体の物質動態と関連する遺伝子の発現変化を明らかにする。

3. 研究の方法

コムギとうどんこ病菌への物質動態の研究

(1) 植物材料、栽培方法

使用した植物材料は、パンコムギ (*Triticum aestivum*) 品種農林4号を用いた。

RI 実験を実施するにあたって、コムギの水耕栽培法を検討した。イネと違い、コムギは水ストレスに弱いので工夫が必要であった。5ml のチップを切断し、上部に切れ込みを入れたスポンジを挿入し、切れ込み部分にコムギ種子を置いた。そして、水耕栽培用の液体肥料ハイポニカ (協和株式会社) を加えた蒸留水を5ml のチップラックに入れ、明期12時間、暗期12時間、温度20度に設定した人工気象器内で育てた。

(2) 放射性同位体を用いた宿主植物からうどんこ病菌への物質移行

うどんこ病菌は、感染後5日から6日のうちに分生胞子を形成する。このことを利用して、コムギ葉に分生胞子を接種し、放射性同位体 ^{14}C に標識された二酸化炭素を充填した袋をコムギ葉の一部にかぶせ、 ^{14}C を植物体内に取り込ませる。オートラジオグラフィによって、罹病葉の ^{14}C 由来の放射線の分布を観察する。そして、分生胞子形成後を粘着テープ等で回収し、オートラジオグラフィによる分生胞子への ^{14}C の移行を確認する。

水耕栽培しているコムギの水耕液に放射性同位体 ^{32}P を加える。そして、 ^{32}P をコムギの根から吸収させる。分生胞子形成後を粘着テープ等で回収し、オートラジオグラフィによる分生胞子への ^{32}P の移行を確認する。

コムギにコムギうどんこ病菌の分生子を接種した。接種葉にアセトセルロースを塗布し、菌糸および分生子と植物体を分離させ、植物体を誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) に供試することで、宿主植物からコムギうどんこ病菌へどのような元素を吸収しているのかを網羅的に調べた。

(3) 遺伝子発現解析

うどんこ病菌を宿主植物に接種し、非 RI 下で、分生子胞子形成までの各感染段階の感染葉から

RNAを抽出し、BrAD-seq法によるRNA-seqライブラリーを作成し、イルミナ次世代シーケンサーNextSeq500によって、RNAシーケンシングを実施した。得られたリード配列を宿主植物とうどんこ病菌の参照配列にアライメントソフトSTAR(Dobin et al. 2013)を用いて、アライメントし、解析ソフトRSEM(Li and Dewey 2011)によって遺伝子発現量を定量した。R言語などを用いて遺伝子発現解析を実施した。

(4) 放射性同位体を用いたうどんこ病菌から宿主植物への物質移行

^{14}C に関して、コムギうどんこ病菌からコムギ葉の物質移行の確認するために、粘着テープで貼り付けた ^{14}C を含む分生胞子をコムギ個体の葉に接種し、液体シンチレーターによって、植物体内への ^{14}C 移行を確かめる。

^{32}P に関して、コムギうどんこ病菌からコムギ葉の物質移行の確認するために、粘着テープで貼り付けた ^{32}P を含む分生胞子をコムギ個体の葉に接種し、オートラジオグラフィによって、植物体内への ^{32}P 移行を確かめる。

(5) イネからイネいもち病菌への物質動態

pi2l 抵抗性に窒素などの物質が関与するかを示すために、放射性同位体を用いていもち病斑への栄養の流れを、いもち病圃場抵抗性 *pi2l* 遺伝子を持つものと持たない品種について実験して比較する。イネの多品種のいもち病病斑における金属含有量を測定する。

4. 研究成果

(1) 宿主植物からコムギうどんこ病菌への物質移行

絶対寄生菌であるコムギうどんこ病菌は、糖などのエネルギー源、タンパク質合成、核酸合成に必要な物質を宿主植物に全面依存している。そのため、これらの物質を構成する元素の放射性同位体を用いれば、宿主植物からコムギうどんこ病菌への物質移行を捉えることができる。本研究では、放射性同位体 ^{14}C を含む $^{14}\text{CO}_2$ を用いたことで、光合成によって作られた同化産物がコムギ葉からコムギうどんこ病菌の物質移行を評価できた。 $^{14}\text{CO}_2$ を添加したうどんこ病菌感染葉をオートラジオグラフで見ると、 ^{14}C 由来の放射線が、特にうどんこ病菌の菌糸が伸展した部位を中心に検出された。このことは、同化産物が、コムギ葉からコムギうどんこ病菌に移行した結果、うどんこ病菌の菌糸に ^{14}C 由来の放射線が検出されたと考えられる。さらに、感染したうどんこ病菌の菌糸上に形成された分生子からも ^{14}C 由来の放射線が観察された。分子の実体は不明であるが、宿主植物で作られた同化産物由来の有機物などの分子が、最終的に分生胞子に蓄積することを意味している。

放射性同位体 ^{32}P をコムギの根から吸収させたところ、放射性同位体 ^{14}C を用いた実験と同様に分生子から ^{32}P 由来の放射線が検出された。このことから、リンを含む分子が、宿主植物からうどんこ病菌の菌糸へ移行し、最終的に分生子に蓄積したと考えられる。しかし、どのような物質であるかは不明であり、今後の研究によって明らかにする必要がある。

また、誘導結合プラズマ質量分析計を用いて、罹病葉と健全葉での物質含量を測定した。Li、P、S、Mg、Asが、健全葉と比較し、罹病葉で減少していた。このことは、コムギうどんこ病菌がこれらの元素を吸収していることを示唆する。 ^{32}P を用いた実験でも、 ^{32}P が分生胞子への移行したことを考えると、宿主を通じて、リンを積極的にうどんこ病菌が利用していることを示唆している。

(2) 宿主植物からコムギうどんこ病菌への物質移行に関与する糖トランスポーターの遺伝子発現解析

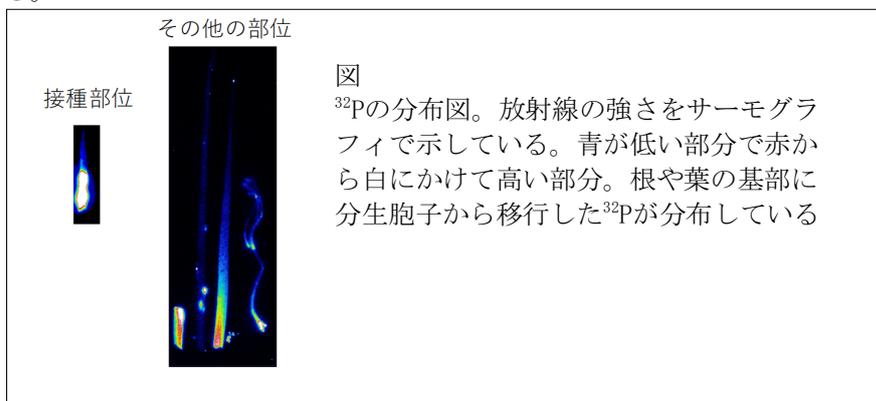
表皮寄生菌であるうどんこ病菌は、表皮細胞の細胞間隙に吸器を作り、宿主植物との間で、同化産物やリンなどの物質のやり取りをしているとされる。これまでの研究で、同化産物である糖は、細胞膜に局在する糖トランスポーターを介して、細胞間隙への糖の排出と細胞間隙からの糖の吸収を調節することが知られている。分生子に蓄積した放射性同位体 ^{14}C も吸器を介して、うどんこ病菌体内へ取り込まれたと考えられる。まだよく分かっていないが、うどんこ病菌にも糖トランスポーターが存在しており、これらの糖トランスポーターが、宿主からの糖の収奪に関与していることが予想される。そこで、これら糖トランスポーターの活性がどのように感染葉で変化するかを、遺伝子発現を指標にして評価した。コムギうどんこ病菌を宿主植物に接種し、分生子が形成されるまでの間を、継時的に罹病葉をサンプリングし、RNAを抽出し、BrAD-seq法によるRNAシーケンシングをした。宿主植物とコムギうどんこ病菌のそれぞれで遺伝子発現の継時的変化を調べた。公開されているコムギうどんこ病菌のゲノム配列情報から16個の糖トランスポーターを同定した。これらトランスポーターの遺伝子発現変化を調べたところ、本研究では、13個の糖トランスポーターについて遺伝子発現を捉えることができた。各トランスポーターは、様々な遺伝子発現変化パターンを示したが、感染初期から分生胞子形成期へと遺伝子発現

量が高くなっていることが観察された。分生孢子形成期へ向かうにつれて、多数の吸器が作られるので、糖トランスポーターを介した糖のやり取りが、宿主と病原菌の間で活発に行われていることが示唆される。

一方、宿主植物では、UniProt に登録されている糖トランスポーターのタンパク質の配列情報を利用して、公開されている宿主植物のゲノム配列情報から 90 個の糖トランスポーターを同定し、これらすべての遺伝子発現データを得ることができた。うどんこ病菌と同様に様々な遺伝子発現変化パターンを示した。そして、その多くは、遺伝子発現変化に周期性を持っていた。抵抗性遺伝子であり、糖トランスポーターである *Lr67* のホモログ遺伝子は、うどんこ病菌の付着器形成から吸器形成時に遺伝子発現が上昇し、分生子形成までの過程で発現続けていた。興味ぶかいことに夜に遺伝子発現が上昇する傾向にあった。

(3) コムギうどんこ病菌から宿主植物への物質移行

^{32}P を含む分生子を宿主植物の第 1 葉に接種したところ、接種葉以外の組織に ^{32}P の放射線が確認された (図)。このことは、分生子由来の P が、宿主植物体全体へ移行したことを示している。また、検出された ^{32}P の放射線は強く、かなりの多くの物質が植物体内を移動していることがわかった。しかしながら、うどんこ病菌が能動的にまたは受動的に P を排出、または、宿主植物が受動的また能動的にうどんこ病菌から P を吸収しているのか不明であり、今後の研究課題である。



^{14}C を含む分生子を宿主植物の第 1 葉に接種し、接種葉以外の展開葉から ^{14}C が検出されるかどうか液体シンチレーターを用いて検証した。その結果、放射線を検出することができた。しかし、分生子が呼吸によって排出した二酸化炭素に ^{14}C を含んでいる可能性がある。分生子の呼吸によって排出された $^{14}\text{CO}_2$ を植物が取り込み、その同化産物の転流による物質移行の結果をみている可能性を排除できない。非 RI 下で、呼吸の影響を排除する様々な実験のデザインを試みたが、研究期間内に、この可能性を完全に排除する実験系を確立できなかった。

(4) イネといもち病菌の相互作用における物質動態

遺伝子は、多様なレースがあるいもち病に対して、ブロードに抵抗性を示す抵抗性遺伝子である。この抵抗性のメカニズムを調べるために、*pi21* 抵抗性の有無の植物に対するいもち病を接種して、放射性同位元素を用いた植物の取り込み実験を行った。その結果、炭素の放射性同位体を用いた実験では、抵抗性の有無による移行の差は見られなかった。一方、放射性同位体の窒素を用いた実験では、罹病性と抵抗性で著しく葉の移行活性に差があることが観察された。*pi21* 抵抗性の有無の植物に対するいもち病を接種して、同位元素の窒素を投与すると、罹病性品種で移行が弱く、抵抗性品種で著しく移行活性が上昇ことを確認した。また、イネの多品種のいもち病病斑における、金属含有量を測定すると、ホウ酸の値が著しく高かった。そこで、ホウ酸トランスポーターの変異株を用いて、いもち病検定を行った。その結果、特定のホウ酸トランスポーターの変異株において、野生株よりいもち病抵抗性の低下が見られた。いもち病抵抗性を付与するために、イネはホウ酸を利用している可能性があり、現在詳細に解析を進めている。

研究期間内に感染葉における RI イメージングの 3 次元化を達成できなかったが、引き続き、絶対寄生菌から植物への物質動態を可視化する技術の開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Inoue H., Hayashi, N (in press) The panicle blast resistance mechanism of *qPbm11* in the rice cultivar, Miyazaki-mochi is independent from that of *Pb1*. *Japan Agricultural Research Quarterly*

- ② Sugano S, Maeda S, Hayashi N, Kajiwara H, Inoue H, Jiang C, Takatsuji H, Mori M (2018) Tyrosine phosphorylation of a receptor-like cytoplasmic kinase, BSR1, plays a crucial role in resistance to multiple pathogens in rice, *The Plant Journal*, 96 (6), 1137-1147
- ③ Inoue H, Nakamura M, Mizubayashi T, Takahashi A, Sugano S, Fukuoka S, Hayashi N (2017) Panicle blast 1 (Pb1) resistance is dependent on at least four QTLs in the rice genome. *Rice*, 10(1), 36.

〔学会発表〕（計2件）

- ① RI イメージングによる植物—病原糸状菌における物質移行
吉田健太郎, 杉田亮平, 神谷岳洋, 田野井慶太郎
日本アイソトープ協会第56回アイソトープ・放射線研究発表会 2019年7月
- ② Pb1 抵抗性は少なくとも4つのQTLに依存する
井上晴彦, 福岡修一, 水林達実, 林長生
日本植物病理学会大会プログラム・講演要旨予稿集 2017P 52 2017年4月

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：井上 晴彦
ローマ字氏名：(INOUE, Haruhiko)
所属研究機関名：農研機構
部局名：生物機能利用研究部門
職名：主任研究員
研究者番号(8桁)：10435612

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：田野井 慶太郎
ローマ字氏名：(TANOI, Keitaro)

研究協力者氏名：杉田 亮平
ローマ字氏名：(SUGITA, Ryohei)

※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、研究者個人に帰属されます。