

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21280

研究課題名(和文)糖吸収を介した植物病原糸状菌の病原性発現機構の解明

研究課題名(英文) Does sugar influx via transporters contribute to fungal virulence?

研究代表者

山田 晃嗣(YAMADA, Kohji)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・助教

研究者番号：40587672

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)：植物病原菌は感染時に宿主植物から糖を炭素源として吸収することが知られているが、その分子機構や意義は不明な点が多い。本研究では、CRISPR-Cas9やCre-loxPシステムを用いて病原糸状菌のウリ類炭疽病菌の網羅的な遺伝子破壊解析を実施し、病原性に関する糖トランスポーターを同定した。さらに、病原性に関する糖代謝酵素も明らかにし、感染時の糖の吸収および代謝が病原性の発現に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
ウリ類炭疽病菌の病原性に関する糖トランスポーター遺伝子や糖代謝遺伝子を同定した。この結果より、糖の吸収および代謝が病原性に関与していることが明らかとなった。今後、これらの生化学的解析を進むことによって、糖の吸収および代謝の阻害を標的とした新規農薬などの開発に繋がることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Phytopathogenic fungi are reported to obtain sugars from their host plants as a carbon source during infection, but the molecular mechanisms remain unclear. In this study, we identified sugar transporters involved in fungal virulence by comprehensive gene disruption analysis of *Colletotrichum orbiculare* using CRISPR-Cas9 and Cre-loxP systems. In addition, we also found sugar-metabolizing enzymes involved in fungal virulence. Together, these results suggested that sugar absorption and metabolism are required for successful infection of *C. orbiculare*.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：糖トランスポーター 病原糸状菌 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

独立栄養生物である植物は、光合成により空気中の二酸化炭素から糖に炭素を固定できる。その一方で、従属栄養生物は他の生物より有機物を摂取することでしか炭素を獲得することができない。近年、従属栄養生物である植物病原菌は感染時に植物から糖を炭素源として吸収していることを示す報告もなされている。しかし、解析例は乏しくそれら分子機構や意義を把握するには程遠い状況であった。

## 2. 研究の目的

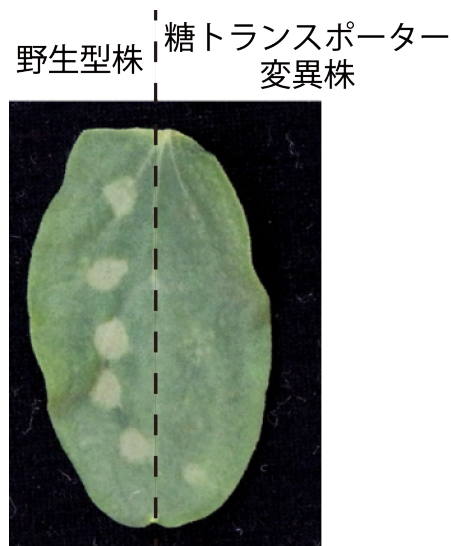
本研究者は、これまでに植物の糖トランスポーターの解析を介して、植物-病原菌間相互作用における栄養吸収の意義を探る研究を行ってきた。本課題では、解析対象を病原菌にも広げることで、植物-病原菌間作用における糖吸収の包括的な理解を目指した。そのためまず、病原菌の病原性に関与する糖トランスポーター遺伝子を単離し、病原菌が宿主植物から糖を吸収する分子機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

農作物の病害要因は糸状菌によるものが大部分を占める。その農学的重要性を考慮し、本研究ではウリ科植物に感染する病原糸状菌のウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) を用いた。ウリ類炭疽病菌の糖トランスポーターの網羅的な遺伝子破壊解析を実施し、病原性が低下した遺伝子破壊株を単離することで病原性発現における糖吸収の意義を探った。しかし、ウリ類炭疽病菌の糖トランスポーター遺伝子は 100 以上あり、さらに機能重複性が予測される遺伝子群でファミリーを形成していることから、遺伝子破壊解析を行うには高効率の遺伝子破壊法と多重遺伝子破壊株の作製法の確立が必要であった。そこで本研究者は、ゲノム編集ツールの CRISPR-Cas9 システムを用いて、相同組み換え効率を上昇させることで高効率遺伝子破壊法の確立を行った。また、遺伝子破壊の際に用いる選択マーカーには限りがあり、破壊できる遺伝子数の上限は選択マーカーの数に等しくなる。そこでより多くの遺伝子を破壊するために、Cre-*loxP* システムをウリ類炭疽病菌用に最適化し、導入した選択マーカーをゲノムから除き再利用を可能にする方法を確立した。この 2 つのシステムを用いることによって、従来法と比べ、ウリ類炭疽病菌の多重遺伝子破壊株の作製を格段に容易にした。

#### 4 . 研究成果

ウリ類炭疽病菌を用いて、糖トランスポーターの遺伝子破壊解析を行った。まず、CRISPR-Cas9 システムを用いて一重遺伝子破壊株を 70 株以上作製した。さらに平行して、Cre-*loxP* システムを用いることで機能重複性が考えられる糖トランスポーター遺伝子ファミリー内の遺伝子おける多重遺伝子破壊株を作製した。それらの解析の結果、病原性が低下した変異体を得ることに成功した(図)。しかし、この糖トランスポーターの生化学解析はまだ進んでおらず、今後の解析が進むことでどのような糖をウリ類炭疽病菌が宿主植物から吸収しているかが明らかになると思われる。さらに本研究では、対象を糖代謝酵素にも広げて遺伝子破壊解析を行ったところ、病原性の低下を示す遺伝子破壊株を単離した。これらの変異体は、病原性の低下以外にも孢子数の減少などの表現型が似ていることから、同一の経路で働くと推測された。以上の結果より、ウリ類炭疽病菌の病原性における糖トランスポーターによる吸収および代謝酵素による糖代謝の重要性が本研究より明らかとなった。



図、ウリ類炭疽病菌の野生型株および糖トランスポーター変異株をキュウリ子葉のそれぞれ左側および右側に接種し、5 日間培養した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Yamada Kohji, Yamamoto Toya, Uwasa Kanon, Osakabe Keishi, Takano Yoshitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 The establishment of multiple knockout mutants of <i>Colletotrichum orbiculare</i> by CRISPR/Cas9 and Cre/loxP systems	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） 10.1101/2021.10.24.465644	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
---------	---------