

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07311

研究課題名(和文) 進化的に保存された付着器形成に関わる物理的疎水面認識機構の解析

研究課題名(英文) Study of the conserved recognition mechanism of appressorial formation of fungal plant pathogens on a hydrophobic surface

研究代表者

田中 千尋 (Tanaka, Chihiro)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：60263133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母で高浸透圧適応に関わるSHO1、MSB2、OPY2をコードする遺伝子ホモログに着目し、これら遺伝子のトウモロコシごま葉枯病菌の付着器形成過程における役割を明らかにしようとした。各遺伝子破壊株とも、宿主植物葉上の付着器形成率はやや低下し、ポリスチレンシャーレ上の付着器形成率は著しく低下した。破壊遺伝子による形成率の差異は認められるものの、これら3遺伝子産物は、物理的な疎水面を認識し付着器形成を行う過程に関わる因子であることが判明した。また、本菌は宿主葉のペクチンならびにポリガラクトuron酸を認識し付着器形成を行うことも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The causal agent of southern corn leaf blight, *Bipolaris maydis* develops infection structures called appressoria on plant leaves and polystyrene surface. In this study, we analyzed roles of SHO1, MSB2 and OPY2 in appressorial development of *B. maydis*. The disruptants of these genes are defective in formation of appressoria on polystyrene surface, but not on plant leaves, suggesting that these genes are involved in physical surface sensing for appressorial formation. Moreover, we elucidated that *B. maydis* develops appressoria in response to plant pectin but not to cutin and hydroxy fatty acid on leaves.

研究分野：植物病理学

キーワード：付着器形成 形態形成 糸状菌 Sho1 Msb2 Opy2

## 1. 研究開始当初の背景

付着器は、多くの植物病原菌類が宿主植物体に侵入するために形成する特殊器官で、その形成は、1)「一般的な疎水面」の認識、2)「宿主植物独特の化学物質」の認識の2つの機構により制御されているものと考えられている。しかし現在までのところ、いずれの認識機構についても詳細なメカニズムは明らかとなっていない。申請者らは、長らく植物病原菌類のストレス応答に関わるシグナル伝達系の研究に携わり、その構成因子は、酵母を含む真菌類で広く保存されているが、酵母と糸状菌で伝達系の詳細や機能が異なることを見出した。さらに、このようなシグナル伝達系の因子の保存性とシグナル伝達系の生理生態学的機能分化は、形態形成に関わるMAPキナーゼシグナル伝達系においても認められている。申請者らは、このような真菌類におけるストレス応答ならびに形態形成シグナル伝達系因子の生理生態学的役割を解明する過程において、酵母菌の浸透圧ストレス応答に関わるSHO1タンパク質の生理生態学的役割が植物病原菌類で変化し、浸透圧ストレス応答ではなく、付着器の形態形成に関わる可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

出芽酵母で高浸透圧適応に関わるSHO1タンパク質をコードする遺伝子のホモログ、ならびにSHO1系路に関連するタンパク質として明らかになってきているMSB2、OPY2をコードする遺伝子ホモログに着目し、これら遺伝子の付着器形成過程における役割を明らかにする。さらに、その解析を通じてトウモロコシごま葉枯病菌の1)「一般的な疎水面」の認識、2)「宿主植物独特の化学物質」の認識に関わる機構に関する知見を得、その解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) SHO1系路の同定

トウモロコシごま葉枯病菌 HIT07711 株ゲノムをHiSeq2000にてシーケンスし、配列データをFastQC、Cutadapt処理後、Velvetを用いてアセンブルして、ゲノムデータベースを構築した。出芽酵母のSHO1、MSB2、OPY2各アミノ酸配列をもとにHIT07711株ゲノムに対しtblastn解析し、それぞれのホモログ遺伝子の配列を得た。各ホモログ遺伝子に対する破壊ベクターを構築し、PEG-プロトプラスト法を用い形質転換を行い、2回相同組替による遺伝子破壊株を得た。必要に応じて薬剤耐性マーカー(HPT、NAT、APT)を使い分け、二重遺伝子破壊株、三重遺伝子破壊株を作出した。これらの株のポリスチレンシャーレならびに宿主トウモロコシ葉上での付着形成能力を調べた。

### (2) 植物由来トリガー成分の探索

ポリスチレンシャーレ上での付着器形成能を持たないOPY2遺伝子破壊株を供試し、宿

主ならびに非宿主植物葉上における付着器形成能を比較した。既知付着器形成誘導物質によるOPY2遺伝子破壊株の付着器形成能に対する効果を調査し、これら物質が付着器誘導を行わないことが判明したので、宿主葉の有機溶媒抽出物、抽出残渣等の付着器誘導活性を調べた。最終的に細胞壁関連の高分子化合物に着目し、市販標品を用いて付着器誘導活性を調べた。

### (3) ゲノム情報を用いた突然変異遺伝子同定手法の開発

全ゲノム配列比較手法により原因突然変異の同定法を開発するにあたり、表現型評価が容易かつメンデル遺伝学的な解析が十分行われているにも関わらず原因遺伝子が分子遺伝学的に明らかにされていない数種薬剤耐性株(Pol2, Pol5, Dic3, Rtf1など)を例として用いることにした。原因突然変異以外の変異を除き、データ解析を容易にするために、戻し交雑による近交系を用いる手法、近交系を用いずデータマイニングにより同定する手法の2ストラテジーで開発・実証を行なった。なお、全ゲノムDNA解読にはHiSeq2000を用い、株あたりのリードデータは6Gb、JGIが提供するC5株ゲノムデータをリファレンスとして用いた。

## 4. 研究成果

### (1) SHO1系路の同定

初めにSho1遺伝子ならびに出芽酵母においてSho1遺伝子相互作用しているとされるMsb2ならびにOPY2遺伝子の遺伝子破壊株を用いて、物理的疎水面であるポリスチレンシャーレ、宿主植物表面であるトウモロコシ葉上での付着器形成率を調査した。野生株では、ポリスチレンシャーレでの分生子培養開始4時間後において約9割の分生子でその発芽菌糸先端に付着器形成が認められた。一方、同条件で、Sho1、Msb2ならびにOPY2遺伝子の各破壊株分生子の付着器形成率を調べたところ、各Sho1、Msb2遺伝子破壊株では、ほとんど付着器形成を起こした分生子は認められず、さらに、OPY2遺伝子破壊株の分生子では付着器を形成したものは皆無であった。また、トウモロコシ葉上での付着器形成率を調査したところ、野生型株では培養6時間後に、9割以上の分生子において付着器形成が認められた。Sho1、Msb2ならびにOPY2遺伝子の各破壊株では、約8割の分生子で付着器が形成されていた。宿主葉上で、Sho1、Msb2ならびにOPY2遺伝子の各破壊株と野生型株との間で付着器形成率に差があるものの、ポリスチレンシャーレ上での差異に比べわずかであり、供試した3破壊株が、ポリスチレン上でほとんど付着器形成を行わなかったことは、これら3遺伝子が物理的疎水面認識に関わる因子であることが強く示唆している。

これら3破壊株分生子をポリスチレンシャーレ上でさらに培養すると、付着器形

成率に違いがあることが明らかとなった。*Sho1* 遺伝子破壊株分生子では培養6時間後に、その2割に付着器が認められるに至った。しかし、*Msb2*、*Opy2* 遺伝子破壊株の分生子では、同時刻において、その約1%でしか付着器が認められず、トウモロコシごま葉枯病菌の *Sho1*、*Msb2*、*Opy2* の各遺伝子は、物理的疎水面認識に関わる因子をコードする遺伝子であるが、その表現型に違いがあり、これはシグナル伝達系における役割の違いを示しているものと考えられた。

そこで、これら3遺伝子の多重遺伝子破壊株を作出し、それら破壊株を用いて、物理的疎水面と宿主植物葉面上での付着器形成率を調査し、各遺伝子間の相互作用についての知見を得ようとした。野生株分生子では、ポリスチレンシャーレ上で4時間培養後、その9割以上で付着器が形成されたが、同時刻の *Msb2 Opy2*、*Msb2 Sho1*、*Opy2 Sho1* 各二重遺伝子破壊株、あるいは *Msb2 Opy2 Sho1* 三重遺伝子破壊株の分生子では付着器形成が皆無であった。また、培養開始後6時間ならびに8時間に、それぞれの多重遺伝子破壊株の付着器形成率を調べたところ全ての多重遺伝子破壊株の分生子の数%でしか付着器形成が認められなかった。*Msb2* あるいは *Opy2* を含む *Sho1* 二重遺伝子破壊株は *Sho1* 一重遺伝子破壊株より低い付着器形成率を示し、その形成率は *Msb2* あるいは *Opy2* 一重遺伝子破壊株と同等あるいはやや低い傾向を示した。さらに、トウモロコシ葉上での付着器形成率調査では、培養6時間後、野生株分生子の9割以上に付着器形成が認められたが、同時刻の *Msb2 Opy2*、*Msb2 Sho1*、*Opy2 Sho1* の各二重遺伝子破壊株の分生子では5~6割程度でしか付着器形成が認められず、*Msb2 Opy2 Sho1* 三重遺伝子破壊株の分生子では4割程度しか付着器形成が認められなかった。物理的疎水面上で、*Sho1* 一重遺伝子破壊株だけが比較的付着器を形成する能力を有していることは物理的疎水面認識には他の2遺伝子産物が優先的役割を果たしている可能性を示唆していると考えられる。また、三重遺伝子破壊株は、物理的疎水面と宿主植物葉面上のいずれにおいても、いかなる一重遺伝子破壊株あるいは二重遺伝子破壊株より、低い付着器形成率を示した。このことは、今回対象とした3遺伝子が、物理的疎水面の認識だけではなく、宿主植物葉面の認識にもある程度関与している可能性を示しているものと思われる。

また、今回作出した、各種遺伝子破壊株の病原性についても、試験を行った。菌叢ディスクならびに分生子を用いた有傷接種では、野生型株ならびに各種遺伝子破壊株で、病斑形成に有意な差はみとめられなかったが、無傷接種では、二重遺伝子破壊株あるいは三重遺伝子破壊株で病斑直径は小さくなっていった。さらに、野生株と三重遺伝子破壊株で侵入サイトを観察した結果、三重遺伝

子破壊株では付着器あたりの侵入率が低く、宿主植物葉面上で形成される付着器の機能に問題を生じている可能性が明らかとなり、*Msb2*、*Opy2*、*Sho1* 遺伝子は、宿主侵入における正常な付着器の形成にも関与していることが強く示唆された。

## (2) 植物由来キユー成分の探索

*Msb2* あるいは *Opy2* 遺伝子破壊株はポリスチレンシャーレ上では付着器形成をほとんど行わず、宿主植物葉上では遥かに高い割合で付着器形成を行うことが上記研究で明らかになった。これらの遺伝子破壊株では、物理的疎水面認識による付着器形成能力が欠損しているために、疎水面による刺激ではなく、宿主葉上に存在する植物由来の刺激(化学成分)を認識し、付着器形成を行なっているものと考えられる。これらの遺伝子破壊株を用いれば、付着器形成のキユーとなっている植物成分を明らかにできるものと考え、*Opy2* 遺伝子破壊株を用いて物質の探索を行った。まず初めに、*Opy2* 遺伝子破壊株が宿主植物特異的に付着器形成を行うか否かを調べた。分生子接種後6時間後、野生型株では宿主トウモロコシ葉上で86%の付着器形成率であり、非宿主キュウリ葉上で60%、非宿主ナス葉上では44%の付着器形成率であった。一方、*Opy2* 遺伝子破壊株では、トウモロコシ葉上で59%、キュウリ葉上で22%、ナス葉上では36%の付着器形成率であった。野生株ならびに *Opy2* 遺伝子破壊株とも、非宿主植物葉上の付着器形成率は宿主葉上よりも低い値であるが、ポリスチレンシャーレ上より遥かに高い割合で付着器を形成した。このことは、キユーとなっている植物成分は宿主特異的というより、少なくとも単子葉植物から双子葉植物にまで広く分布するものである可能性が示唆された。また、*Opy2* 一重遺伝子破壊株の葉上における付着器形成部位を調査したところ、90%を超える付着器が細胞接合部位で形成されていた。なお、野性型では同部位における付着器割合は77%であった。

つぎに、イネいもち病菌などで、付着器形成を誘導することが明らかとなっている 16-hydroxyhexadecanoic acid、1-hydroxytriacontan、蜜蝋をスライドガラスに塗布し、*Opy2* 遺伝子破壊株の付着器形成率に及ぼす影響を明らかにしようとした。ガラス面へのこれら化合物の塗布は *Opy2* 遺伝子破壊株の付着器形成率になんら影響を与えず、トウモロコシごま葉枯病菌は、これら化合物をキユーとして用いていないことが明らかとなった。さらに、トウモロコシ葉へキサソールあるいはメタノール抽出物を塗布したスライドガラス上での付着器形成率を調べてみたが誘導効果は認められなかった。しかし、溶媒抽出残渣(抽出後のトウモロコシ葉)上において *Opy2* 遺伝子破壊株は有意に付着器を形成した。以上の結果はトウモロコシごま葉枯病菌では、イネいもち病菌などで明らかにされている葉面ワックスなどの葉

上表面の脂溶性分子がキュー化合物として認識しているのではなく、ヘキサンあるいはメタノール不溶性の植物細胞表面層に関連する化合物である可能性が窺えた。そこで、植物細胞壁関連の高分子化合物の効果を調べたところ、ペクチンならびにポリガラクトン酸塗布により *Opy2* 遺伝子破壊株はガラス面上に有意に付着器を形成するようになることが判明した。ペクチンは細胞間隙（細胞接合部位）に多く含まれる高分子化合物であることから、*Opy2* 遺伝子破壊株が細胞接合部位に付着器形成を行う先の観察結果を合理的に説明できる。

(3) ゲノム情報を用いた突然変異遺伝子同定手法の開発

(2) の研究成果から、本菌はペクチンあるいはポリガラクトン酸を植物由来キュー因子として付着器形成を行っていることが明らかとなった。さらに、*Opy2* 遺伝子破壊株を突然変異剤処理し、ペクチン存在下で付着器形成能を消失した突然変異株を分離・解析することにより植物由来キュー因子による付着器形成シグナル伝達路の解明につながるものと期待できる。このような考えのもと、突然変異株の分離を試みた。突然変異株の分離ならびにスクリーニングは継続中であるが、突然変異遺伝子同定のために必要なゲノム情報を用いた手法の開発を行った。研究室で保存されている突然変異株のうち、表現型が明白でその原因遺伝子が分子遺伝学的に明らかにされていない数種薬剤耐性遺伝子を実施例として、全ゲノム配列比較手法による原因突然変異の同定が可能か否かを調べた。HiSeq2000 により得られたリードデータを Cutadapt によりアダプター混入配列を排除し、BWA を用いたリファレンスゲノムへのマッピング、SAMtool を用いた多型サイトリスト化を経て各菌株特異的な多型サイトの位置情報を得た。今回供試した野生型株と C5 株リファレンスゲノムの間には約 55,000 の多型サイトが存在し、その多くは反復配列を伴う多型であった。このような多型サイトは、戻し交雑によっても消失せず、その原因として不等交差による新たな多型の生成が考えられた。また、突然変異処理後第一世代では約 60,000 の多型サイトが存在していた。これらの多型サイトの位置情報とリファレンスゲノムの ORF の位置情報やその ORF のアノテーション情報を perl あるいは python スクリプトを用いて処理し、各菌株特異的な塩基配列多型の中から原因突然変異の同定を試みた。その結果、近交系株の比較することによって高い確率で原因突然変異の同定が可能であることを実証した。また、近交系の作出を行わなくとも、独立に得られたアリルを持つ複数の突然変異株を比較することでも、原因突然変異の同定が可能であった。さらに、突然変異株の表現型からある程度、突然変異遺伝子の機能が予測できる場合は、アノテーション情報を利用

し、突然変異遺伝子の絞り込みを行い、少数の菌株を用いた連鎖解析によっても原因遺伝子の同定が可能であった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Takuya Sumita, Kosuke Izumitsu, Chihiro Tanaka, Characterization of the autophagy-related gene BmATG8 in *Bipolaris maydis*, Fungal Biology, Volume 121, 2017, 785 - 797

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.008>.

Daidi Chen, Hiroshi Masumoto, Yuki Kitade, Kosuke Izumitsu, Chihiro Tanaka, Genetic analyses of reddish-brown polyoxin-resistant mutants of *Bipolaris maydis*, Mycoscience, 査読有, Volume 59, 2018, 236 - 246

<https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.12.002>.

[学会発表](計18件)

北出雄生ら、トウモロコシごま葉枯病菌の *CLA4* と菌糸伸長の関連性、第15回糸状菌分子生物学コンファレンス、(2015年11月、府中)

吉田裕史ら、プレオスポラ目菌にユニークな -キシロシダーゼホモログの発現解析、第15回糸状菌分子生物学コンファレンス、(2015年11月、府中)

住田卓也ら、ウリ類炭疽病菌の 26S プロテアソームサブユニット RPN10 ホモログは病原性に関与する、第15回糸状菌分子生物学コンファレンス、(2015年11月、府中)

吉田裕史ら、トウモロコシごま葉枯病菌の植物体侵入時におけるキシラン分解行動の解析、平成28年度日本植物病理学会大会、(2016年3月、岡山)

北出雄生ら、トウモロコシごま葉枯病菌の *CLA4* PAK-like kinase は病原性、形態形成、極性決定に必須である、日本菌学会60周年記念大会、(2016年9月、京都)

吉田裕史ら、トウモロコシごま葉枯病菌のキシロース代謝能欠損体の性状、日本菌学会60周年記念大会、(2016年9月、京都)

陳帯娣ら、トウモロコシごま葉枯病菌のある種 PKS 遺伝子は *Pol2* 突然変異依存的に発現する、第16回糸状菌分子生物学コンファレンス(2016年11月、宇治)

吉田紘樹ら、トウモロコシごま葉枯病菌の物理的疎水面認識および付着器形成を制御する *Opy2* の解析、第16回糸状菌分子生物学コンファレンス(2016年11月、宇治)

奥谷芙季ら、トウモロコシごま葉枯病菌の付着器侵入に関連するテトラスパニン遺伝子 *Pls1* の機能解析、第16回糸状菌分子生

物学コンファレンス(2016年11月、宇治)  
山田淳司ら、トウモロコシごま葉枯病菌の高浸透圧応答シグナル伝達における *Skn7* の機能解析、第16回糸状菌分子生物学コンファレンス(2016年11月、宇治)

吉田裕史ら、トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* におけるキシラン応答機構の解析、第16回糸状菌分子生物学コンファレンス(2016年11月、宇治)

吉田裕史ら、宿主細胞壁五炭糖類により誘導されるトウモロコシごま葉枯病菌の糖代謝フラックス変動、環境微生物系学会合同大会2017(2017年8月、仙台)

住田卓也ら、ウリ類炭疽病菌の F-box 遺伝子 *CoGRR1* は付着器細胞の生存維持に重要である、第17回糸状菌分子生物学コンファレンス(2017年11月、佐賀)

重吉沙衣ら、全ゲノム解析手法に基づく抗真菌性化合物 Tolnifanide 作用点の解析、第17回糸状菌分子生物学コンファレンス(2017年11月、佐賀)

辻健也ら、トウモロコシごま葉枯病菌におけるエキソサイトーシス関連因子 *Exo70* の機能解析、第17回糸状菌分子生物学コンファレンス(2017年11月、佐賀)

西行優子ら、*Bipolaris maydis* におけるジカルボキシミド系殺菌剤耐性に関わる *Dic3* 遺伝子の同定、第17回糸状菌分子生物学コンファレンス(2017年11月、佐賀)

北出雄生ら、トウモロコシごま葉枯病菌の Septin の同定と機能解析、第17回糸状菌分子生物学コンファレンス(2017年11月、佐賀)

陳帯姉ら、全ゲノム比較手法を用いたトウモロコシごま葉枯病菌 *pol2* ポリオキシン耐性株赤色素合成遺伝子の同定、平成30年度日本植物病理学会大会、(2018年3月、神戸)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 千尋 (TANAKA, Chihiro)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：60263133

### (2) 研究分担者

泉津 弘佑 (IZUMITSU, Kosuke)  
滋賀県立大学・環境科学部・助教  
研究者番号：20579263

### (3) 連携研究者

なし