

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18650

研究課題名(和文) しらが病菌によるアワの穂の葉化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of leaf-like flower development in foxtail millet induced by downy mildew

研究代表者

小林 光智衣 (Kobayashi, Michie)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究員

研究者番号：10751539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アワしらが病菌の全ゲノム解読とRNA-seq解析を行った結果、ゲノムサイズは約360Mbであり、推定の遺伝子数は16736個だった。推定の分泌タンパク質は1220個あり、既知のエフェクター様タンパク質に加えてJacalin様タンパク質を多くコードしていた。Jacalin様タンパク質は感染初期に遺伝子発現が誘導され、感染時のアポプラスト画分に検出されたことから、感染初期に植物の防御応答を抑制することが示唆された。罹病した穂では花成の負の制御因子であるMADS47の発現が増加していた。一方、正の制御因子の一部はタンパク質の蓄積が減少することがわかり、これが葉化病徴の引き金になっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sclerospora graminicola is an economically important pathogen of foxtail millet. Colonization of the pathogen in panicles triggers a transformation of florets into leafy structures. Whole genome sequencing of *S. graminicola* revealed that estimated genome size was approx. 360 Mbp and 16736 genes were predicted from the RNA-seq data. Of a total of 1220 genes encoding putative secreted proteins, including a number of Jacalin-related lectin (JRL) proteins in addition to conserved effector-like proteins. A number of JRLs were induced in early infection phase and seven were detected in apoplastic fluids from infected leaves, suggesting that they play roles as apoplastic effector. In infected panicles, MADS47 expression was significantly increased despite during reproductive phase. On the other hand, some of positive regulator of floral development decreased protein accumulation. It is suggested that these effects trigger a transformation of flowers into leafy structures.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌ゲノム 病原性エフェクター

### 1. 研究開始当初の背景

アワしらが病は、卵菌の一種である *Sclerospora graminicola* (Sacc.) Schroet. によって引き起こされるアワの重要病害である。しらが病菌に感染した植物では正常な花が咲かずに葉化し、穂は葉状突起が集合した奇形を示す。これは、収量の著しい低下を招く。しかしながら、その原因解明はほとんどなされてこなかった。

申請者がアワしらが病に罹病した穂を詳細に調べたところ、(1) 葉状突起は穎が肥大伸長したものであること、(2) 雄ずいは形態が変わらないか、実体顕微鏡レベルでは退化して確認できないこと、(3) 雌ずいは実体顕微鏡では確認できないか、奇形を生じ緑化して伸長肥大していること、が明らかとなった。

罹病した植物の花の葉化は、トウモロコシ糸黒穂病やファイトプラズマ病で先行研究がある。糸黒穂病の感染穂ではオーキシン濃度が上昇し、活性酸素種が蓄積することから、病徴発現はこれらシグナルを介すると推測される (Ghareeb et al., 2011)。ファイトプラズマ病では、ファイトプラズマにコードされるエフェクタータンパク質が引き金となり、花成を正に制御する MADS-box 転写因子が分解されることで、病徴が誘導される (MacLean et al., 2014; Maejima et al., 2014)。一方、しらが病を含む単子葉類のべと病では分子生物学的解析のための研究基盤がなく、研究はほとんど進んでいなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、しらが病菌の全ゲノム解読およびトランスクリプトーム解析を行い、しらが病菌が分泌するエフェクターを同定する。また、植物側のトランスクリプトーム解析を行うことにより、葉化を誘導する植物側の因子を同定する。最終的にはエフェクターによる植物因子の制御機構を解析し、アワしらが病の発病機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) しらが病菌の全ゲノム解析

しらが病菌単遊走子分離株の遊走子嚢からゲノム DNA を抽出し、ペアエンドシーケンス (約 350 kb の DNA 断片) および、メイトペアシーケンスを行なった。得られたリードデータは Platanus を用いて de novo assembly を行い、しらが病菌ゲノムリファレンスを完成させた。

#### (2) 感染植物における RNAseq 解析

しらが病菌の遊走子嚢および遊走子の懸濁液をアワに接種し、遊走子および遊走子嚢 (侵入前)、接種 16 時間後、1、2、3 日後の葉、および接種 1 から 3 週間後の穂から RNA を調製し、RNA-seq 解析を行なった。

#### (3) 感染葉アポプラストタンパク質の解析

しらが病菌接種後 1、3 日の感染葉からアポプラスト画分を抽出し、MS 解析を行なった。

#### (4) しらが病菌エフェクター候補の機能解析

ゲノム解読および RNAseq 解析から単離され

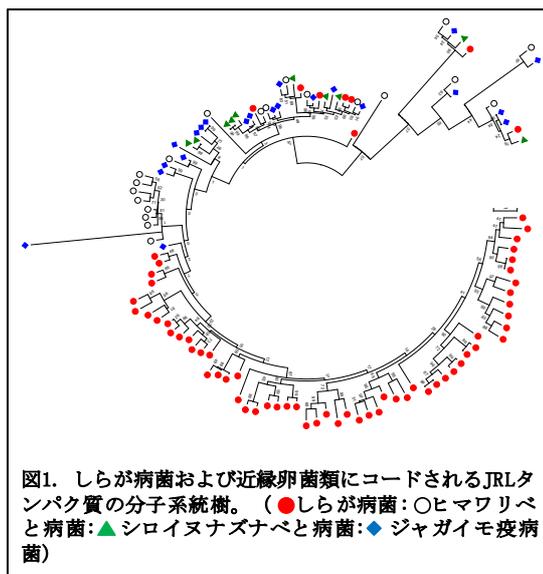
たエフェクター候補は、イネ形質転換体またはベンサミアーナ葉での一過的発現で解析を行なった。イネ形質転換体の評価は見た目の表現型とキチン応答を指標に行なった。ベンサミアーナ葉での一過的発現では f1g22 応答および *Phytophthora palmivora* の感染応答で評価を行なった。

#### (5) アワ SiMADS タンパク質蓄積量の解析

アワの MADS-box タンパク質のうち、SiMADS14、SiMADS15、SiMADS18 を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、罹病穂での蓄積量を解析した。

### 4. 研究成果

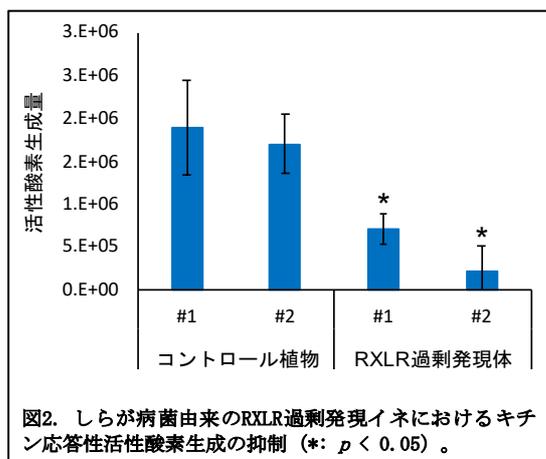
(1) アワしらが病菌の全ゲノム解析を行なった結果、推定ゲノムサイズは約 360Mbp と植物病原菌としては最大級であり、ゲノム配列の少なくとも 73% はリピート配列であった。RNA-seq 解析の結果から予測された遺伝子数は 16736 個であった。このうち、エフェクター候補となりうる推定の分泌タンパク質は 1220 個コードされ、既知のエフェクター様タンパク質に加えて Jacalin 様レクチンドメインを含むタンパク質 (JRL) が多数含まれていた (図 1)。



(2) しらが病菌 JRL 遺伝子の多くは感染初期に発現誘導されていた。感染初期の葉から抽出したアポプラストタンパク質を MS 解析した結果、7つの JRL が同定された。同定された JRL をベンサミアーナ葉に一過的に発現させて防御応答を解析したところ、このうち1つの JRL は f1g22 に応答した活性酸素生成を抑制し、卵菌類の一種である *P. palmivora* の感染を助長した。以上より JRL は感染初期にアポプラストに分泌され、植物の免疫応答を抑制する働きがあることが示唆された。

既知のエフェクター様構造をもつタンパク質のうち、RXLR を過剰発現させたイネ形質転換体を作成して解析した。RXLR 形質転換体の中には生育を著しく抑制するもの、自発的な細胞死を誘導するもの、キチンに応答した活

性酸素生成を抑制するものがあつた (図 2)。以上より、RXLR はしらが病菌においても植物の防御応答を撓乱する作用を持つことが示唆された。



(3) 葉化した罹病穂の遺伝子発現解析を行なったところ、健全穂と比較して花成の負の制御因子であり、通常は栄養成長組織で発現する SiMADS47 の発現が著しく増加していた。一方、Class A MADS-box と Class E MADS-box の一部を除く正の制御因子のほとんどは発現量が低下していた。しらが病菌感染で遺伝子発現量に変化がなかった正の制御因子のうち、SiMADS14、15、18 を特異的に認識する抗体を作製し、ウェスタンブロット解析によりタンパク質蓄積を調べたところ、少なくとも SiMADS14 と SiMADS15 は感染に伴ってタンパク質量が減少していた (図 3)。SiMADS14 と SiMADS15 は Class A に分類される MADS-box であり、初期の花芽形成で鍵となる重要な因子である。しらが病菌の感染によってこれら MADS-box タンパク質が消失することが、葉化病徴の引き金になっていることが示唆された。

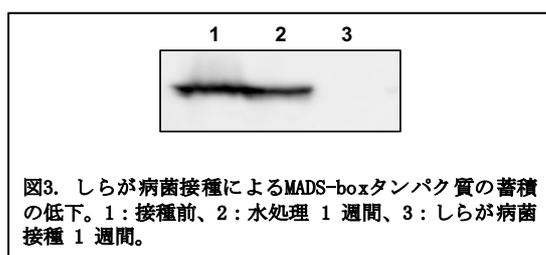


図3. しらが病菌接種によるMADS-boxタンパク質の蓄積の低下。1: 接種前、2: 水処理 1 週間、3: しらが病菌接種 1 週間。

#### <引用文献>

- ① Ghareeb H, et al. (2011) *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiol* 156: 2037-2052.
- ② MacLean AM, et al. (2014) Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol* 12: e1001835.
- ③ Maejima K, et al. (2014) Recognition

of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *Plant J* 78: 541-554.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Michie Kobayashi, Yukie Hiraka, Akira Abe, Hiroki Yaegashi, Satoshi Natsume, Hideko Kikuchi, Hiroki Takagi, Hiromasa Saitoh, Joe Win, Sophien Kamoun, Ryohei Terauchi, Genome analysis of the foxtail millet pathogen *Sclerospora graminicola* reveals the complex effector repertoire of gramincolous downy mildews. *BMC Genomics*, 2017, 18:897. DOI: 10.1186/s12864-017-4296-z

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小林光智衣・平賀幸江・八重樫弘樹・夏目俊・阿部陽・高木宏樹・齋藤宏昌・寺内良平、アワしらが病ゲノムの解析、平成 27 年度植物感染生理談話会、2015
- ② 小林光智衣・平賀幸江・植村亜衣子・阿部陽・高木宏樹・齋藤宏昌・寺内良平、アワしらが病菌の全ゲノムシーケンス解析によるエフェクター候補遺伝子の探索、平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016
- ③ Kobayashi M, Hiraka Y, Abe A, Yaegashi H, Natsume S, Kikuchi H, Takagi H, Saitoh H, Win J, Kamoun S, Terauchi R, Whole genome sequencing of the oomycete pathogen *Sclerospora graminicola* and prediction of effector candidates. XVII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions., 2016
- ④ 小林光智衣、アワしらが病菌の全ゲノムシーケンス解析、農学中手の会、2016
- ⑤ 小林光智衣・平賀幸江・阿部陽・八重樫弘樹・夏目俊・菊池秀子・齋藤宏昌・寺内良平、アワしらが病菌では Jacalin 様レクチンが独自に進化している、第 58 回日本植物生理学会年会、2017
- ⑥ 小林光智衣・平賀幸江・阿部陽・八重樫弘樹・夏目俊・菊池秀子・寺内良平、アワしらが病菌新規エフェクター候補の解析、第 59 回日本植物生理学会年会、2018

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 光智衣 (KOBAYASHI, Michie)  
(公財) 岩手生物工学研究センター・研究員  
研究者番号 : 10751539

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

平賀 幸江 (HIRAKA, Yukie)  
(公財) 岩手生物工学研究センター・技術員