

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07679

研究課題名（和文）細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構解析による病害防除に向けた有用遺伝子の探索

研究課題名（英文）Identification of genes for disease protection by analyzing plant-pathogen interactions at a cellular level

研究代表者

浅井 秀太（ASAI, SHUTA）

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：30723580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：宿主植物と病原菌の関係においては、病原菌が標的とする、感染するために必要な宿主側の遺伝子（罹病性遺伝子）が存在し、罹病性遺伝子を欠損させた植物体には病原菌は感染することができない。罹病性遺伝子は、病原菌にとって宿主侵入前後における必須因子であることが予想されるため、持続的な病害抵抗性に貢献しうる遺伝資源と期待される。本研究では、“細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構解析”および“免疫不全変異体を用いた順遺伝学的スクリーニング”を通して、べと病に対する罹病性遺伝子の候補を得ることに成功した。現在、その機能解析を進めると共に、有用作物への応用を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

べと病は、キャベツなどのアブラナ科作物や、レタス、ハウレンソウ、更にはヒマワリなどでの重要病害として広く知られており、古くから抵抗性品種が利用されてきた。しかし、これら抵抗性品種の多くは、gene-for-geneで制御されるような抵抗性遺伝子による抵抗性であり、新レースの出現と抵抗性打破のリスクを常に招いている。罹病性遺伝子は、病原菌にとって宿主侵入前後における必須因子であることが予想されるため、持続的な病害抵抗性に貢献しうる遺伝資源と期待される。また、罹病性遺伝子は劣性遺伝子であるため、有用作物において遺伝子組換え以外の手法で遺伝子破壊をすることで、耐病性を付与することが可能である。

研究成果の概要（英文）：In the relationship between host plants and pathogens, there are genes on the host side, so-called susceptibility genes, that are required for infection by pathogens. Mutation or loss of a susceptibility gene can limit the ability of the pathogen to cause disease. I am therefore conducting research on susceptibility genes as useful genes that can contribute to disease control. In this study, I obtained susceptibility gene candidates to downy mildew through forward genetic approach and cell type-specific transcriptome approach using Arabidopsis thaliana, a model plant. I am proceeding with their functional analysis and aiming to apply them to crops.

研究分野：植物病理学

キーワード：罹病性遺伝子 病害防除 トランスクリプトーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

べと病は、キャベツやブロッコリー、ハクサイに代表されるアブラナ科作物に留まらず、レタスやホウレンソウ、更にはヒマワリなどでの重要病害として広く知られており、古くから抵抗性品種が利用されてきた。しかし、これらべと病菌に対する抵抗性品種の多くは、**gene-for-gene** で制御されるような抵抗性 (**resistance : R**) 遺伝子による抵抗性であり、このような **R** 遺伝子利用による抵抗性品種は、新レースの出現と抵抗性打破のリスクを常に招いている。宿主植物と病原菌の関係においては、病原菌が標的とする、感染するために必要な宿主側の遺伝子 (罹病性遺伝子) が存在する。罹病性遺伝子を欠損させた植物体には病原菌は感染することができない。オオムギにおいて、うどんこ病菌に対する罹病性遺伝子 *mlo* の機能欠損株は、実際に圃場で 30 年以上利用されており、付与される抵抗性を打破できるうどんこ病菌は現れていない。このことは、罹病性遺伝子が永続的な病害防除に貢献しうる因子であることを示している。また、罹病性遺伝子は劣性遺伝子であるため、有用作物において遺伝子組換え以外の手法で遺伝子破壊をすることで、耐病性を付与することが可能である。

シロイヌナズナとシロイヌナズナに感染するべと病菌との相互作用についての研究により、べと病菌に対する抵抗性において重要なサリチル酸に応答する遺伝子 *PR1* は、べと病菌が感染している細胞では発現しておらず、それらの周辺の細胞において発現していることが知られていた (PLoS Biology e1001732, 2013)。一方、べと病菌に対する罹病性遺伝子として知られる *DMR6* 遺伝子は、べと病菌が感染している細胞でのみ発現する (Plant J. 54:785-793, 2008; Plant J. 81:210-222, 2015)。重要なことに、べと病菌が感染した葉全体をサンプルとしたトランスクリプトーム解析の結果からは、*PR1* および *DMR6* 遺伝子間の発現パターンの差を検出できなかった (PLoS Pathogens 10(10):e1004443)。*DMR6* と同じ発現挙動を示す遺伝子は、べと病菌の推定の標的遺伝子であり、新奇の罹病性遺伝子である可能性が高い。感染時に、*DMR6* と同じ発現挙動を示す遺伝子を同定するためには、感染した細胞特異的な解析を行う必要があるが、べと病菌は、表皮細胞だけでなく主に葉肉細胞に感染する (吸器を形成する) ため、従来のレーザーマイクロダイセクションのような手法での解析は困難であり、別の解析手法の開発を必要としていた。

また、順遺伝学的な手法による新奇罹病性遺伝子の同定に向けて、植物免疫において重要な植物ホルモン (サリチル酸、ジャスモン酸、エチレン) の合成やシグナル伝達に関わる重要な 4 つの遺伝子を欠損させた免疫不全シロイヌナズナ変異体 (*dde2/ein2/pad4/sid2* 四重変異体; PLoS Genetics 2009 e1000772) を基に、エチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理により付加的な突然変異を導入し、べと病菌に対して抵抗性を示す変異体のスクリーニングを進めていた。

2. 研究の目的

本研究では、“細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構解析”および“免疫不全変異体を用いた順遺伝学的スクリーニング”を通して、べと病に対する新奇の罹病性遺伝子を同定し、その機能解析を行うと同時に有用作物への応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構解析

細胞生物学的な解析の結果、べと病菌が感染している (吸器を形成している) 細胞とその周りの細胞において *DMR6* と *PR1* がそれぞれ特異的に発現していることが明らかとされていた (Plant J. 54:785-793,2008; PLOS Biol. 11(12):e1001732,2013)。そこで、*PR1* と *DMR6* プロモーターを利用し、リボソーム複合体精製による Translatome 法 (PNAS 44:18843-18848, 2009) を応用することで、べと病菌感染時にそれぞれのプロモーターが活性化された細胞特異的なトランスクリプトーム解析を行った。

(2) 免疫不全変異体を用いた順遺伝学的スクリーニング

EMS 処理により変異導入した M2 の免疫不全シロイヌナズナ変異体を用いて、べと病菌に対して抵抗性を示す変異体を選抜した。得られた抵抗性変異体の戻し交配 (免疫不全変異体とのクロス) を行い、F2 世代の表現型を基にしてゲノムシークエンスを行い、原因遺伝子 (罹病性遺伝子候補) を同定し、その機能解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構解析

PR1、および *DMR6* プロモーターを利用した細胞特異的なトランスクリプトーム解析を実施し、それぞれと同じ発現挙動を示す遺伝子候補を得た。本研究では、*DMR6* と同じ発現挙動を示す遺伝子 (罹病性遺伝子候補) に注目した。計 8 遺伝子については、プロモーターに *GUS* を連結したコンストラクトを作製し、その形質転換シロイヌナズナを作製した。作製した形質転換体にべと病菌を接種し、*DMR6* と同様にべと病菌が感染している細胞で特異的に発現が誘導されることを確認した。続いて、これら罹病性遺伝子候補の欠損および過剰発現シロイヌナズナを作製し、

べと病菌に対する抵抗性の評価を行った。その結果、シロイヌナズナにおける過剰発現によって、べと病菌に対して高罹病性を示す遺伝子が見つかった。つまり、罹病性遺伝子の候補を得ることに成功した。現在、この遺伝子の機能解析を進めている。

(2) 免疫不全変異体を用いた順遺伝学的スクリーニング

EMS 処理により変異導入した免疫不全シロイヌナズナ変異体において、べと病菌に対して抵抗性を示す変異体を数株得ることに成功した。得られた変異体について、他の病原菌に対する抵抗性の評価を行ったところ、**1** ラインについては、べと病菌に加えて、炭疽病菌、*Pseudomonas* 属菌に対しても抵抗性を示した。このラインについては、戻し交配を行い、ゲノムシーケンスにより、原因遺伝子（罹病性遺伝子候補）の同定に成功した。現在、この遺伝子の機能解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Asai S., Ayukawa Y., Gan P., Masuda S., Komatsu K., Shirasu K. and Arie T.	4. 巻 8
2. 論文標題 A high-quality draft genome sequence of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> strain 160527, a causal agent of Panama disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00654-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00654-19	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Asai S., Furzer O.J., Cevik V., Kim D.S., Ishaque N., Goritschnig S., Staskawicz B.J., Shirasu K. and Jones J.D.G.	4. 巻 9
2. 論文標題 A downy mildew effector evades recognition by polymorphism of expression and subcellular localization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41467-018-07469-3	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Wirthmueller L., Asai S., Rallapalli G., Sklenar J., Fabro G., Kim D.S., Lintermann R., Jaspers P., Wrzaczek M., Kangasjärvi J., MacLean D., Menke F.L.H., Banfield M.J. and Jones J.D.G.	4. 巻 220
2. 論文標題 Arabidopsis downy mildew effector HaRxL106 suppresses plant immunity by binding to RADICAL-INDUCED CELL DEATH1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 232-248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/nph.15277	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 浅井秀太	4. 巻 28
2. 論文標題 圃場病原ゲノミクス -土壌診断法の開発にむけて-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 植物細菌病談話会論文集（第28号）ISSN 1346-5767	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hillmer R.A., Tsuda K., Rallapalli G., Asai S., Truman W., Papke M.D., Sakakibara H., Jones J.D.G., Myers C.L. and Katagiri F.	4. 巻 13(5)
2. 論文標題 The highly buffered Arabidopsis immune signaling network conceals the functions of its components	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1006639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006639	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Prince D.C., Rallapalli G., Xu D., Schoonbeek H.-J., Cevik V., Asai S., Kemen E., Cruz-Mireles N., Kemen A., Belhaj K., Schornack S., Kamoun S., Holub E.B., Halkier B.A. and Jones J.D.G.	4. 巻 15:20
2. 論文標題 Albugo-imposed changes to tryptophan-derived antimicrobial metabolite biosynthesis may contribute to suppression of non-host resistance to <i>Phytophthora infestans</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI 10.1186/s12915-017-0360-z	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 比較ゲノム解析を通じたフザリウム分化型解析マーカーの構築と応用
3. 学会等名 令和2年度植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 比較ゲノム解析を通じたフザリウム分化型解析マーカーの構築
3. 学会等名 令和元年度植物病理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 圃場病原ゲノミクス -土壌診断法の開発にむけて-
3. 学会等名 第12回フザリウム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 Identification and characterization of revertants of the dde2/ein2/pad4/sid2-quadruple mutant, which exhibit disease resistance
3. 学会等名 XVIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 dde2/ein2/pad4/sid2復帰突然変異体の同定および表現型解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 Identification and characterization of revertants of the dde2/ein2/pad4/sid2-quadruple mutant, which exhibit disease resistance
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 植物病原菌の巧妙な認識回避の“術”
3. 学会等名 第4回農学中手の会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 フザリウム分化型解析マーカー構築に向けた比較ゲノム解析
3. 学会等名 平成30年度植物病理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 圃場病原ゲノミクス -土壌診断法の開発にむけて-
3. 学会等名 平成30年度（第28回）植物細菌病談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構解析による病害防除に向けた有用遺伝子の探索
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 細胞レベルでの宿主病原菌相互作用機構の解析
3. 学会等名 第3回農学中手の会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 罹病性遺伝子の同定に向けたdde2/ein2/pad4/sid2の復帰突然変異体のスクリーニング
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 病原ゲノミクスによる土壌診断法の開発
3. 学会等名 平成29年度植物感染生理談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 Subtilisin-like proteaseは植物病原細菌に対する抵抗性を正に制御する
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所植物免疫研究グループ
http://plantimmunity.riken.jp/index_ja.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----