

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05660

研究課題名（和文）病原菌由来因子による宿主気孔形成制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanism of host stomatal formation by pathogen-derived virulence factors

研究代表者

館田 知佳（Tateda, Chika）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30774111

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）：気孔侵入型のリンドウ葉枯病菌（*Septoria gentianae*）による宿主植物の気孔密度制御を介した感受性誘導機構を解明することを目的として、感染葉で機能するリンドウ葉枯病菌由来の病原性因子の探索と機能解析を行った。リンドウ葉枯病菌のゲノム解析および同菌感染時のトランスクリプトーム解析から、Candidate secreted effector proteins（CSEPs）として146候補因子を同定し、そのうち少なくともCSEP49がリンドウ葉の気孔形成を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Systemic induced susceptibility（SIS）という現象そのものがほとんど報告されておらず、実態もよくわかっていなかった。リンドウ葉枯病菌が感染葉で利用するCSEP49の研究を通して、気孔形成制御を伴うSISの誘導機構が見え始めた。また本現象が、リンドウや葉枯病菌に限定されたものではなく、幅広い植物種で普遍的に見られる現象であることが見えてきた。今後、気孔侵入型の病原菌に対する新たな防除システムの構築などに発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：To understand the pathogen-mediated regulatory mechanism of stomatal density in gentian plants infected by *Septoria gentianae*, a filamentous fungus that invades plant tissues through stomata, we performed the screening of fungal virulence effectors involved in the regulation of host stomatal density. Genome and transcriptome analyses identified 146 effector candidates (Candidate Secreted Effector Proteins : CSEPs) of *S. gentianae*. Of the CSEPs, at least CSEP49 promoted stomatal formation in gentian.

研究分野：植物病理学

キーワード：感受性誘導 糸状菌 リンドウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の葉に存在する気孔は、宿主植物、病原体双方において生存競争の場となる重要な器官である。気孔は細菌や一部の糸状菌にとって植物組織内への侵入口であり、これまで、気孔の開閉制御を中心とした植物と病原体との相互作用は多くの研究がなされている。一方で、気孔の数そのもの(気孔密度)をめぐる攻防については、ほとんど知られていない。本研究で着目するリンドウ葉枯病菌(*Septoria gentianae*)は、気孔から侵入・感染するリンドウ(*Gentiana L.*)の病原糸状菌である。栽培リンドウの品種/系統に利用されているエゾリンドウの品種/系統と、ササリンドウの品種/系統間に認められるリンドウ葉枯病菌に対する抵抗性強度の差は、葉の向軸面の気孔密度と相関している。研究代表者のグループは、リンドウ葉枯病菌が局所的に一次感染したリンドウにおいて、その上位葉(非感葉)の気孔密度が、対照区と比較して有意に増加することを見出した。気孔密度が増加した新生葉にリンドウ葉枯病菌が二次感染すると、リンドウ葉枯病菌に対する感受性が増加する。これは、近年その現象が報告されつつある Systemic induced susceptibility (SIS) の一つであると考えられた。植物-病原体間相互作用における SIS の知見そのものが限られており(Cui et al. 2005; Lake and Wade, 2009)、その実態はよくわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、病原菌による SIS の一環としての非感染上位葉での気孔形成促進作用というこれまで知られていない現象に着目し、関連するリンドウ葉枯病菌因子の同定とその機能解明を行うことである。研究代表者のグループが見出したリンドウ葉枯病菌による上位葉の気孔形成促進効果は、角皮侵入を行うリンドウ炭疽病菌感染においては見られなかった。これらのことから、気孔侵入するリンドウ葉枯病菌が二次感染時の自身の侵入効率をあげるために上位葉での気孔密度を増加させる動的な感受性誘導を引き起こしている可能性が示唆された。葉の向軸面に気孔が存在しないリンドウの「To 系統」はリンドウ葉枯病菌を無傷接種しても病徴が観察されない強抵抗性を示すが、有傷接種時には病徴をともなう一次感染の成立が確認される。この To 系統の非感染上位葉における気孔形成促進は、リンドウ葉枯病菌を無傷接種した際には観察されず、有傷接種時においてのみ認められた。このことから、非感染上位葉における気孔形成促進には、リンドウ葉枯病菌の一次感染の成立が必須であり、感染時に発現する病原性因子の関与が示唆された。そこで、気孔形成制御を伴う SIS を誘導するために感染葉で機能するリンドウ葉枯病菌因子の同定とその機能解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、SIS 誘導時に感染葉で機能するリンドウ葉枯病菌由来因子の探索を行うために、リンドウ葉枯病菌感染時のトランスクリプトーム解析により同菌のエフェクター候補遺伝子(Candidate Secreted Effector Proteins: CSEPs)を同定する。CSEPsのうち、実際に新生葉での気孔形成促進効果のあるものを特定するために、ベンサミアナタバコの葉に局所的かつ一過的にアグロバクテリウムを介して CSEPs を発現し、その新生葉の気孔数を測定することで探索を行う。上記スクリーニングで SIS 誘導活性が確認された CSEPs について、リンドウの形質転換体を作製し、リンドウでの CSEPs の活性と機能について解析を行う。また、リンドウ葉枯病菌と CSEPs による気孔形成制御を伴う SIS 誘導が、他の気孔侵

入型病原菌と植物の相互作用においても普遍的に存在するシステムであるのかについて着目し、病原体のエフェクターの共通性の解析や各病原体による新生葉での二次感染に対する感受性強度試験により検証する。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析によるリンドウ葉枯病菌由来のCSEPsの探索

リンドウ葉枯病菌のゲノム解析および同菌感染時のトランスクリプトーム解析から、CSEPsとして414候補因子を同定した。414候補因子の中から特に、侵入後の感染初期に発現が誘導される146候補因子に着目し、(2)のスクリーニングへ供試した。

(2) ベンサミアナタバコを用いた気孔形成促進因子のスクリーニング

ベンサミアナタバコの葉に局所的かつ一過的にアグロバクテリウムを介してCSEPsを発現し、その新生葉の気孔数を測定した結果、3つのCSEPsが気孔形成促進効果を示した。このうち、CSEP49は、植物のホルモン様ペプチドをコードするタンパク質に相同性を示すタンパク質であった。また、CSEP13もCSEP49と相同性を示すタンパク質であったが、CSEP13は気孔形成促進効果を示さなかった。

(3) 病原性因子欠損型リンドウ葉枯病菌ならびに病原性因子発現リンドウ形質転換体の作出と評価

プロトプラスト法およびアグロバクテリウム法を用いてリンドウ葉枯病菌の形質転換を試みたが、形質転換体の作出には成功しなかった。形質転換に用いるベクターの改良など、今後改めて取り組むべき課題であると考えている。一方で、リンドウ形質転換体の作出は成功しており、現在詳細な機能解析を進めているところである。また、リンドウのトランスクリプトーム解析から、CSEP49と相同性を示すリンドウ因子(Gs#1)の存在が明らかになった。そこで、大腸菌で発現・精製したCSEP49ペプチドおよびGs#1ペプチドをリンドウに処理し、気孔形成促進能を検証した。その結果、CSEP49ペプチド、Gs#1ペプチドどちらの処理区においても、対照区と比較して新生葉の気孔数が増加し、リンドウ葉枯病菌に対する感受性も誘導された。このことから、CSEP49は、Gs#1と相同な機能を持ち、そのシステムを乗っ取ることにより、SISを誘導しているのではないかと考えられる。さらに、Gs#1によるベンサミアナタバコ葉の気孔形成促進には、分泌シグナルが必要であり、Gs#1が細胞外に排出されることで気孔形成が誘導されることが示唆された。

(4) 他の気孔侵入型病原菌の病原性因子との比較

シュードモナス属細菌を局所的に感染させたシロイヌナズナ、タバコ、トマトの新生葉でも、SISが誘導された。これらの病原体のエフェクタータンパク質およびリンドウ葉枯病菌のCSEPsには共通性が見られない。一方で、CSEP49様タンパク質は、植物に広く保存されており、植物側の共通因子がSIS誘導に関与していることが示唆された。

(5) 病原性因子発現時に誘導されるシグナル因子の検証

CSEP49 および Gs#1 が発現したベンサミアナタバコの葉柄から得られる分泌液を、新たなベンサミアナタバコに処理すると、新生葉での気孔形成促進効果が見られた。現段階では、分泌液中に CSEP49 または Gs#1 そのものの存在は確認できていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tateda Chika, Obara Kazue, Abe Yoshiko, Sekine Reiko, Nekoduka Syuuichi, Hikage Takashi, Nishihara Masahiro, Sekine Ken-Taro, Fujisaki Koki	4. 巻 32
2. 論文標題 The Host Stomatal Density Determines Resistance to Septoria gentianae in Japanese Gentian	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 428 ~ 436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-05-18-0114-R	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chika Tateda, Masahiro Nishihara, Mari Iwai, Kazue Obara, Koki Fujisaki
2. 発表標題 The Relationship Between Flower Color and Disease Resistance Against Septoria gentianae in Japanese Gentian, Possible Involvement of Flavonoids and Related-compounds in Blue Pigmentation
3. 学会等名 IS-MPMI XVIII Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 館田知佳, 清水元樹, John Jewish A. Dominguez, 岩井摩利, 小原和恵, 西原昌宏, 藤崎恒喜
2. 発表標題 リンドウ葉枯病菌による全身的な感受性誘導機構の解明
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	清水 元樹 (Shimizu Motoki) (90734343)	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・主任研究員 (81202)	

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