

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14440

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスを用いた植物病原糸状菌のエフェクター分泌機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the effector secretion pathway of plant pathogenic fungi using chemical genetics

研究代表者

熊倉 直祐 (Naoyoshi, Kumakura)

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：50815438

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)：植物病害糸状菌はエフェクタータンパク質を分泌することで宿主植物の免疫反応や細胞壁などの物理障壁を打破し感染を成立させる。エフェクターの分泌は時空間的に精密に制御され、特異的な分泌経路の存在が示唆されるものの、その分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。本研究では炭疽病菌のエフェクター分泌阻害剤を用い、エフェクター分泌の分子機構の解明・解析手法の開発を目的とした。本研究ではエフェクター分泌阻害剤の標的候補遺伝子を同定した。さらに、冗長性のある標的候補遺伝子の炭疽病菌での解析を可能にするマーカーリサイクリング法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中で多額の作物被害をもたらす植物病原糸状菌は基礎・応用の両面で重要な研究対象である。本研究では植物病原菌が感染時に分泌するエフェクターの分泌阻害剤に機能アノテーションを付与した。また、モデル植物病害糸状菌における高効率な多重変異体作製技術の開発にも成功した。本手法は、エフェクター分泌に寄与する遺伝子のみならず、病原性に寄与するエフェクター研究にも応用可能であるため、植物病害糸状菌の感染戦略の分子メカニズム解明に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phytopathogenic fungi secrete effector proteins to break down immune responses and physical barriers, such as cell walls, of host plants to establish infection. Although the secretion of effectors is precisely regulated in space and time, suggesting the existence of a specific secretory pathway, the molecular mechanism of the secretion is not clarified. In this study, I aimed to elucidate and analyze the molecular mechanism of effector secretion using the effector secretion inhibitors of the *Colletotrichum* fungi. This study identified target candidate genes for effector secretion inhibitors. Furthermore, I have succeeded in developing a marker recycling method for *Colletotrichum orbiculare*, a causing agent of anthracnose of Cucurbits, that enables the analysis of functionally redundant genes.

研究分野：植物病理学、微生物学

キーワード：エフェクター分泌 マーカーリサイクリング CRISPR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病原系状菌はエフェクターと呼ばれる一群の遺伝子産物を駆使することで植物への感染を成立させる。エフェクターは「宿主植物細胞の状態や構造を変化させ、病原体の感染・生存を助けるもの」と定義され、例えば植物の免疫反応を抑制するもの、病原体の侵入を阻む物理的な障壁である細胞壁を分解する酵素活性を有するものなどが知られている (Petre *et al.*, 2014, PLOS Biol.)。近年ゲノム解読技術の進歩によって、多くの植物病原系状菌のゲノムが解読され、一例として炭疽病菌ゲノムは数百から千個程度のエフェクターをコードすると推定されている (Gan *et al.*, 2013, New phytol., Richard *et al.*, 2012, Nature Genet.)。

エフェクターがその機能を果たすためには、適切な場所へ分泌される必要がある。例えば、トウモロコシ黒穂病を引き起こす植物病原系状菌 *Ustilago maydis* は宿主細胞内に Cmu1 エフェクターを、細胞外には Pep1 エフェクターをそれぞれ分泌し、宿主植物の免疫反応を抑制する (Mueller *et al.*, 2013, PLOS Pathogens, Djamei *et al.*, 2011, Nature)。このように植物病原系状菌がエフェクターを特異的に分泌する機構を持つことを示す報告があるものの「多種多様なエフェクターを必要な部位へどのように分泌しているのか？」この問いに答える分子メカニズムの全容は明らかになっていない。その原因は幾つか考えられるが、遺伝学的なスクリーニングで原因遺伝子が報告されていないことから、ノックアウト変異体の表現型が致死の遺伝子や冗長性のある遺伝子群が分泌を担っていることが原因と考えられる。

そこで申請者はケミカルバイオロジー的手法を用いて上記の問題を解決し、植物病原系状菌のエフェクター分泌機構の分子メカニズムの解明を試みた。申請者はこれまでにモデル病原系状菌の一つである炭疽病菌を用い、エフェクター分泌阻害剤のハイスループットスクリーニング法の開発・実施に成功した。すでに天然物を中心とした約 2 万化合物からなるライブラリー (理研 NPDepo) からエフェクターの分泌を阻害し、かつ炭疽病菌の病原性を抑制する 30 個のヒット化合物を得ている。これら 30 ヒット化合物が機能を阻害する遺伝子産物・経路はエフェクター分泌に関与すると考えられる。ケミカルジェネティクス的手法を用い、30 ヒット化合物の標的因子の同定およびその機能を解明する。

2. 研究の目的

本研究では申請者がこれまでに同定した炭疽病菌のエフェクター分泌阻害剤 30 個の標的遺伝子産物の同定・作用機序の解明を通じて、エフェクター分泌の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

30 種のエフェクター分泌阻害剤の標的遺伝子産物・経路の同定を、酵母の実験系を用いたケミカルジェネティクス的手法 (薬剤耐性株の取得) で試みた。また、炭疽病菌における標的遺伝子の解析のための形質転換技術の改良・開発を実施した。

4. 研究成果

本研究では以下の 3 つの研究を実施した。(1) 酵母におけるケミカルジェネティクスを用いたエフェクター分泌阻害剤の標的解析、(2) エフェクター分泌阻害剤の標的遺伝子変異体の作出・表現型解析、(3) 候補遺伝子群の機能解析のための技術開発。それぞれの内容を以下に詳述する。

(1) 酵母におけるケミカルジェネティクスを用いたエフェクター分泌阻害剤の標的解析

酵母におけるケミカルジェネティクス的手法を用い、30 化合物の標的候補遺伝子の機能アノテーションを付与した。その結果、少なくとも 2 種の化合物 (P7、P21) の標的候補遺伝子に関連遺伝子が含まれていることを明らかにした。そこで P7 の薬剤耐性株を分裂酵母で取得し、原因遺伝子の探索を試みた。3 株の独立した薬剤耐性株を取得したが、3 株に共通した変異は見られなかった。

(2) エフェクター分泌阻害剤の標的遺伝子変異体の作出・表現型解析

ウリ類炭疽病菌において、(3) で開発した手法を用いて逆遺伝学的手法を用いて、P7 の標的候補遺伝子の同定を試みた。ケミカルジェネティクスを用いて同定された P7 の標的候補遺伝子をウリ炭疽病菌での遺伝子破壊を試みたが、欠損株は取得できなかった。また昨年度までに開発したマーカーリサイクリング法も組み合わせ、分泌関連遺伝子の破壊を実施した。これまでのところ、病原性に関連する遺伝子は得られてない。今後はエフェクター分泌阻害剤に結合する炭疽病菌タンパク質のケミカルバイオロジー的手法を用いた同定を計画している。

(3) 候補遺伝子群の機能解析のための技術開発

マーカーリサイクリング法の確立: 炭疽病菌においてマーカーリサイクリング法を開発し、原理的に無制限の回数の遺伝子破壊が可能になった。マーカーリサイクリング法には、酵母や *Aspergillus* 属菌等で用いられる orotidine 5 phosphate decarboxylase をコードする *URA3*

遺伝子を利用した。*URA3*は真菌において広く保存され、uridineの合成に必須な遺伝子である。*ura3*変異体は培地にuridineを添加しなければ生育できない。したがって、*ura3*変異体で形質転換をする際には*URA3*発現カセットが選抜マーカーとして利用できる。また*URA3*はネガティブセレクションマーカーとしても機能する。*URA3*はウリジン前駆体のアナログである5-fluoroorotic acid(5-FOA)を毒性のある物質へと変換する。この性質を利用し、相同的な配列の間に*URA3*発現カセットを位置するように設計し、5-FOAを処理すると、相同組み換えにより*URA3*発現カセットがループアウトした株のみを選抜することができる。炭疽病菌の*URA3*を用いたマーカーリサイクリング法をウリ類炭疽病菌で確立することに成功した。

CRISPR/CAS9を用いた相同組換の高効率化：炭疽病菌では相同組み換えを用いた遺伝子破壊が可能である。この際、破壊する遺伝子によっては相同組み換えが不可能なもや、効率が非常に低いものがあった。遺伝子の破壊効率は標的とするDNAを切断することで上昇させることができる。これは、ドナーDNAで標的とするDNAが切断されることでhomology-directed repair(HDR)が誘導され、相同組換効率が向上するためである。本研究では炭疽病菌において、CRISPR/CAS9を用いた相同組換を実施し、破壊が困難だった遺伝子について、高効率の破壊を可能にした。

DNA断片を用いた遺伝子破壊技術の開発：炭疽病菌の相同組み換えには大腸菌での大量生成が可能なプラスミドDNAが用いられてきた。この手法は簡単に多量のDNAが精製できる利点があるものの、クローニング・形質転換・培養に時間がかかるという難点があった。一方、本研究ではCRISPR/CAS9による相同組換の高効率化のため、形質転換に必要なDNA量を減らすことが可能になった。そこで、PCRで増幅したDNA断片を用いた相同組換を実施したところ、これに成功した。これにより、相同組み換えのドナーDNAの準備時間の大幅な短縮が可能になった(Plasmid: 約7日 DNA断片: 1日)。

以上の3つの技術を組み合わせ、炭疽病菌において高速・高効率な多重変異体の作製が可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Gan Pamela, Hiroyama Ryoko, Tsushima Ayako, Masuda Sachiko, Shibata Arisa, Ueno Akiko, Kumakura Naoyoshi, Narusaka Mari, Hoat Trinh Xuan, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 Subtelomeric regions and a repeat-rich chromosome harbor multicopy effector gene clusters with variable conservation in multiple plant pathogenic Colletotrichum species	5. 発行年 2020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) https://doi.org/10.1101/2020.04.28.061093	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 該当する

1. 著者名 Tsushima Ayako, Gan Pamela, Kumakura Naoyoshi, Narusaka Mari, Takano Yoshitaka, Narusaka Yoshihiro, Shirasu Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic Plasticity Mediated by Transposable Elements in the Plant Pathogenic Fungus Colletotrichum higginsianum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1487 ~ 1500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/gbe/evz087	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 Kumakura Naoyoshi, Ueno Akiko, Shirasu Ken	4. 巻 20
2. 論文標題 Establishment of a selection marker recycling system for sequential transformation of the plant-pathogenic fungus Colletotrichum orbiculare	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/mpp.12766	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 NaoNaoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasuyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu
2. 発表標題 Colletotrichum orbiculare ribonuclease-type effectors potentiate host immune responses in their catalytic residues dependent manner
3. 学会等名 IS-MPMI XVIII Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊倉直祐, Pamela Gan, 石濱伸明, 白須賢
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌の二次代謝物生成酵素遺伝子PKS13は宿主植物葉への侵入に必要である
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan ¹ , Ayako Tsushima ^{1,3} , Mari Narusaka ⁴ , Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu
2. 発表標題 Fungal phytopathogen-secreted ribonucleases potentiate host immune responses
3. 学会等名 30th Fungal Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2019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