

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19206

研究課題名(和文)植物細胞で機能するエフェクター様因子探索を目的とした希少さび病菌遺伝子情報の収集

研究課題名(英文)Collection of genetic information of rare rust fungi for the search of effector-like factors functioning in plant cells

研究代表者

平塚 和之(Hiratsuka, Kazuyuki)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：30202279

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):数種の異なるさび病菌乾燥標本から様々なDNA抽出手法を試みた。その結果、既存の方法では十分な破砕効果が得られず、全ガラス製ホモジナイザーでのみ冬胞子の破砕が可能であることが判明した。従って、供試試料が十分でない場合は本研究の対象としては難度が高く、実施は困難であると思われる。核酸試料を分析したところ、20kb以下の断片化したDNAが殆どであることが判明した。エフェクター評価系としてのアグロバクテリウムによる一過性発現系については、発光レポーターを用いた実験系の最適化と、導入効率を向上させる新規生理活性物質の添加により既存の系と比較して3倍程度の効率で実施可能な方法を見出すことが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病原菌の乾燥標本という、これまでは分子生物学的研究対象とは見なされていなかった試料を用い、それらを再発掘し利用するという点が、本研究の学術的特色である。さらに、そこから得られた遺伝子情報に基づいて、植物病原菌の新たなエフェクターを探索し、植物細胞で機能する新規なDNA結合因子あるいは転写制御因子等を探索するという試みは、新規な遺伝子工学あるいは遺伝子編集技術に繋がる可能性を有しており、応用上の発展展開の可能性も秘めている。また、古い乾燥標本の保全の面にも配慮している点は、学術資料の次世代への継承という点で社会的意義もあると思われる。

研究成果の概要(英文):Various DNA extraction methods were tried on several different dried rust specimens. It was found that existing methods did not provide sufficient crushing effect and that only an all-glass homogenizer was capable of crushing the winter spores. Therefore, if the amount of specimen was not sufficient, it would be a difficult subject for this study and would be difficult to implement. Analysis of the nucleic acid samples revealed that most of them were fragmented DNA of 20 kb or less. For the transient expression system using Agrobacterium as an effector evaluation system, we found a method that can be implemented with about three times higher efficiency than the existing system by optimizing the experimental system using luciferase reporter and adding a novel bioactive compound that improves transduction efficiency.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 さび病菌 エフェクター 一過性発現 NGS解析

1. 研究開始当初の背景

さび病菌の多様性と特殊性は、その宿主範囲、形態、生活環、核相移行など多岐におよび、それらの背景となる遺伝子機能の多様性にも期待が持たれる。しかし、さび病菌は人工培養がほぼ不可能であり、分子細胞生物学の方法論を駆使した研究対象として適しておらず、重要植物病原であるにもかかわらず、ゲノム解析やエフェクター探索が実施された例はコムギ黒さび病菌など2, 3種のみである。

応募者はこれまでに、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究の支援により「希少さび病菌標本の遺伝子修復と次世代シーケンサーによる時空間的遺伝子動態解析」を平成28~29年度に実施し、希少さび病菌標本からのゲノムDNA抽出とそれらの解析方法に関するノウハウを確立した。一方で、最近の各種病原微生物が有するエフェクターに関する研究が進展し、様々な知見が集積されつつあり、「植物細胞で機能する微生物の遺伝子」として糸状菌由来のエフェクター研究からもたらされる知見には学術上・応用上の多大なる期待が寄せられている。そこで、これまでの研究の蓄積を活かし、応募者ならではの研究環境(希少さび病菌標本を多数所有し、分子生物学的手法を駆使できる)の現況を鑑み、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

植物病原微生物が有するエフェクターは感染機作解明の鍵となる植物病理学、微生物学の重要事項であると同時に、TALENに代表されるゲノム編集や遺伝子工学のツールとしても興味を持たれる。植物病原糸状菌の一群を形成する「さび病菌」は代表的な絶対寄生菌として広範囲に分布し、主要植物病害とも認識されている。また、宿主との共進化により独特の生活環と他には見られない宿主交代等、固有の宿主-寄生者間相互作用が存在する。しかし、ほとんどの場合、さび病菌は培養が不可能であることから、分子遺伝学的方法の適応は困難であり研究対象として選ばれてこなかった。一方、申請者は乾燥試料として保存されている、過去100年以上にわたる期間に及ぶ膨大な数のさび病菌の罹病植物標本を所蔵している。本研究では、それらの乾燥標本に包埋された寄生菌と宿主植物の遺伝情報を最新のDNA修復技術、解析技術を駆使して回収・解析する手法を駆使し、宿主と病原体の相互作用に関する新奇因子を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) さび病菌標本からの遺伝子抽出・増幅・複製と品質評価を実施する。この時点で、必要に応じて遺伝子修復を試みる。次世代シーケンサー(NGS)解析に適したサンプルが得られれば、ゲノムの配列情報取得する。

(2) アグロバクテリウム法による一過性発現系を高効率化し、多穴プレートを用いたイントロン挿入型発光レポーターによる遺伝子発現解析系について検討する。

4. 研究成果

(1) さび病菌標本からのDNA抽出方法について、これまでの知見に基づいて、SDSとプロテイナーゼK存在下でガラスホモジナイザーあるいはプラスチックペッスルによる手法を中心に検討した。本研究では比較的菌体の入手容易で、技術的蓄積があるメダケ赤衣病菌(*Stereostromatium corticioides*)を用いて優良解析試料DNAの取得を試みた。当初はプラスチックペッスルをモーターで駆動する方法を用いてDNA抽出操作を行うことを計画し1.5mLマイクロチューブの中でプラスチック製のペッスルを用いて菌体(冬孢子)を破碎する方法を試行した。その結果、メダケ赤衣病菌を用いた場合は不十分ながら抽出可能であることが判明した。一方、比較のためにササ類さび病菌(*Puccinia* sp.)を用いた場合では、十分なDNA量が得られず、今後課題を残した。その理由は、磨砕操作の結果生じた微少なキズを有するチューブ表面やペッスルに無視できないDNA吸着が生じている可能性が考えられた。今のところ、ガラスホモジナイザーか、モーター

で駆動させたプラスチック製ペッスルを用いる方法以外にさび病菌の胞子から効率良く核酸試料を抽出可能な系は見あたらないが、この方法ではガラス面あるいはプラスチック面に対する吸着は不可避であり、微量サンプルの NGS 解析を想定した場合、重要な今後の検討課題であると思われる。一方、ゲノム情報からのエフェクター候補遺伝子の探索については、既存のゲノム情報を用い、特定のアミノ酸配列をプローブとした配列探索を試み、効率改善の余地は大いにあるものの、一定のノウハウを得ることが出来た。

(2) アグロバクテリウム法による一過性発現系については、シロイヌナズナ発芽種子に対して、多穴プレートを用いた感染系を構築し、イントロン挿入型のルシフェラーゼレポーターを用いた遺伝子発現モニタリング系による、エフェクター候補遺伝子の評価系について検討した。その結果、96 穴～384 穴プレートを用いたアグロバクテリウム法による一過性発現系を確立することが出来、レポーターを有する菌体と、エフェクター候補遺伝子を発現するコンストラクトを有する菌体を同時感染させることにより、レポーター発現に与える影響を連続観察可能なシステムを構築することが出来た。また、新規に申請者らが開発したジャスモン酸メチルのアゴニストを用いることにより、発現効率が3倍程度向上することも新たに見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuyuki Hiratsuka	4. 巻 86
2. 論文標題 Studies on regulated expression of plant defense genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 531-533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-020-00960-0	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 -

1. 著者名 Hagiwara Hiroyuki, Ogura Rieko, Fukumoto Takeshi, Ohara Toshiaki, Tsuda Mikio, Hiratsuka Kazuyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Novel bacterial control agent tolprocarb enhances systemic acquired resistance in Arabidopsis and rice as a second mode of action	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 39 ~ 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-019-00891-5	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷓之沢 敦志、小倉 里江子、平塚 和之
2. 発表標題 アグロバクテリウムの感染効率を向上させる新規化合物のスクリーニング系の評価について
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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