

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06062

研究課題名(和文) アワしらが病菌による葉化病徴誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of phyllody symptoms caused by downy mildew in foxtail millet

研究代表者

小林 光智衣 (Kobayashi, Michie)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・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)：葉化病徴誘導時には、花成を正に制御するClass A MADSタンパク質の蓄積が減少する一方で負の制御因子であるSVP-MADSの発現が誘導される。SVP-MADSの発現誘導機構を解明する目的で、プロモーター領域のモチーフ解析、ChIP解析を試みたが解明には至らなかった。病原菌因子としてJacalin様レクチン(JRL)を解析した。少なくとも8つのJRLはしらが病菌感染時にアワのアポプラストに分泌されていた。またベンサミアーナ葉を使った解析から、JRLは植物の抵抗反応を一部抑制して菌の感染を促進することがわかった。以上から、JRLはしらが病菌が分泌する病原性エフェクターであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アワしらが病菌が感染し、葉化病徴を誘導する機構を解析した。葉化組織では感染によるMADS-boxの攪乱が示唆された一方で、詳細な機構解明には至らなかった。病原菌因子の解析では、JRLが病原性エフェクターとして機能する可能性を示した。これまでに、JRLが病原性に関わることを明確に示した報告はなく、しらが病菌を含む卵菌類の感染機構を明らかにする上で、新しい成果と言える。

研究成果の概要(英文)：When *Sclerospora graminicola* (Sg) colonized the panicles, the organs are transformed into leafy structures (phyllody). In phyllody-induced panicles, SVP-MADS expression was induced. We have analyzed the regulatory mechanism of SVP-MADS expression, but without clear results.

Jacalin-related lectin (JRL) gene family has significantly expanded in Sg genome. We identified eight JRLs via protein mass spectrometry analysis of extracellular fluid from Sg-inoculated foxtail millet leaves. JRL expression was induced by Sg infection. Heterologous expression of three JRLs with N-terminal secretion signal peptides in *Nicotiana benthamiana* enhanced the virulence of the pathogen *Phytophthora palmivora* inoculated onto the same leaves. INF1-mediated induction of defense-related genes was suppressed by co-expression of JRL. These findings suggest that JRLs are novel apoplastic effectors that contribute to pathogenicity by suppressing plant defense responses.

研究分野：植物病理学

キーワード：アワしらが病 ベと病 植物病原菌エフェクター 葉化病徴

1. 研究開始当初の背景

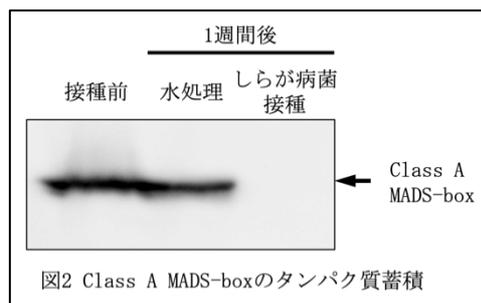
アワしらが病は、卵菌の一種である *Sclerospora graminicola* (Sacc.) Schroet. によって引き起こされるアワの重要病害である。しらが病菌に感染したアワでは正常な花が咲かずに葉化し、穂は葉状突起が集合した奇形 (phyllody) を示す (図1)。葉化により宿主であるアワの栄養成長期が長引けば、しらが病菌は自身の増殖機会を増大することができると考えられ、葉化誘導は、しらが病菌が進化させてきた寄生戦略だと考えられる。しかし、葉化病徴の原因解明はほとんどなされてこなかった。

申請者らによるこれまでの研究から、しらが病菌はアワの MADS-box 転写因子の作用を攪乱することで葉化を誘導していることがわかってきた。MADS-box は、花成をはじめとする植物の器官形成で働く転写因子である。罹病穂の MADS-box 遺伝子の発現量を健全穂と比較したところ、花成の抑制因子である MADS47 の発現量が著しく増加していた一方、正の制御因子のほとんどは発現量が低下していた。さらに、花器官形成の初期に働き、下流の MADS-box の発現量を誘導するとされる Class A MADS-box の遺伝子発現量に変化はなかったが、これらの遺伝子産物は、感染に伴いタンパク質蓄積が低下していた (図2)。以上より、しらが病菌は、Class A MADS-box タンパク質をターゲットとして分解することにより、下流の MADS-box の発現を攪乱し、葉化を誘導すると予想された。



2. 研究の目的

本研究の目的は、しらが病菌による Class A MADS-box タンパク質の分解機構を解析することにより、しらが病菌の葉化誘導因子を特定し、その作用メカニズムを解明することである。具体的には、アワの Class A MADS-box タンパク質と相互作用するしらが病菌タンパク質を探索し、葉化誘導因子候補とする。候補因子の詳細な生化学的解析を行うとともに、アワの近縁野生種であり遺伝子導入法が確立されたエノコログサにおいて候補遺伝子を過剰発現させることで、最終的な葉化誘導の機能証明を行う。



3. 研究の方法

(1) Class A MADS-box による MADS47 転写制御の検証

① 次世代シーケンスしたアワゲノム配列からプロモーターを含む SVP MADS-box のゲノム配列を単離して解析した。Class A MADS-box の大腸菌リコンビナントタンパク質を作成し、MADS47 ゲノム領域に対する結合を検証した。

② Class A MADS-box に制御される遺伝子を探索するために、アワの Class A MADS-box である SiMADS14、15、18 に対する抗体を用いて ChIP 解析を行った。ChIP 解析は、しらが病菌を感染させた幼穂抽出物を使った ChIP-seq と、リコンビナント SiMADS14、15、18 タンパク質を使った DAP-seq を行った。

(2) しらが病菌エフェクタータンパク質の機能解析

① 感染時に発現誘導されるしらが病菌因子について、アワの野生種であり形質転換系が確立されたエノコログサに過剰発現させて葉化誘導の有無を検証した。

② 感染時に発現誘導されるしらが病菌因子について、広く病原性機能を検証するために、ベンサミアーナ葉に一過的に発現させて病原菌の感染に対する影響を検証した。また、植物の抵抗反応に対する影響を検証するために、卵菌類が生産する PAMP の一種である INF1 に対する抵抗反応を解析した。

4. 研究成果

(1) Class A MADS-box による MADS47 転写制御の検証

① MADS47 のゲノム配列を解析したところ、MADS-box の結合配列である CArG モチーフが複数箇所見つかった。Class A MADS-box の大腸菌リコンビナントタンパク質を作成し、CArG モチーフを含むシス配列に対する結合を検証したが、明確な相互作用は認められなかった。

② 抗 Class A MADS-box 抗体とアワの幼穂抽出サンプルを使った in planta での結合解析を試みたが、結合配列を見出すことはできなかった。また、リコンビナント Class A MADS-box タンパク質とアワゲノムから抽出したゲノム DNA 断片を材料として in vitro で結合する配列を探索するために DAP-seq 解析を行なったが、結合配列を見出すことはできなかった。

(2) しらが病菌エフェクタータンパク質の機能解析

① 感染時に発現誘導されるしらが病菌因子のうち細胞外分泌シグナルをもつものについて、エノコログサに過剰発現させて穂の形質を調査したが、葉化を誘導する因子は得られなかった。
 ② しらが病菌に特徴的な遺伝子として見出された Jacalin 様レクチン(JRL)に着目して解析を行った。しらが病菌を感染させたアワ葉のアポプラストタンパク質を抽出して質量分析した結果、8種類のJRLを含むしらが病菌分泌タンパク質が同定された(表1)。8つのJRLはいずれも感染時に遺伝子発現が誘導されていた。アポプラストにおけるJRLの機能を解析するために、ベンサミアーナ葉を使った一過的遺伝子発現系を用いた。病原卵菌である *Phytophthora palmivora* の感染に対する影響を調べたところ、8つのうち一部のJRLについて、細胞外分泌シグナルペプチドを付加した場合(SP+)には感染を促進する効果がみられた一方、シグナルペプチドを付加しないJRL(Δ SP)では感染促進効果は認められなかった(図3)。もっとも促進効果の高かったJRLについてさらに解析を行なった結果、卵菌由来のPAMPsの一つであるINF1に誘導される防御関連遺伝子の発現を抑制した(図4)。一方で、INF1に誘導される細胞死に対する影響は認められなかった。ベンサミアーナ葉での局在を確認するために、JRLとGFPとの融合タンパク質を発現させて解析したところ、シグナルペプチドを付加JRLはアポプラストと細胞膜上に局在した(図5)。以上から、JRLは植物の基礎的抵抗反応を抑制することでしらが病菌の病原性に寄与することが示唆された。

表1. アワしらが病菌感染様から抽出したタンパク質の質量分析結果

遺伝子名	MW	アノテーション	反復1	反復2
SG14735	35,549	arabinofuranosidase	✓	
SG08752	49,348	calreticulin precursor	✓	
SG02395	50,987	exonuclease	✓	
SG14267	61,637	glucose-methanol-choline oxidoreductase	✓	
SG02945 ^b	19,042	JRL	✓	✓
SG03255 ^b	16,328	JRL	✓	✓
SG04896	18,357	JRL		✓
SG05109 ^b	19,699	JRL	✓	✓
SG05127	18,563	JRL	✓	
SG06536 ^b	16,412	JRL	✓	✓
SG10124 ^b	17,422	JRL	✓	✓
SG17166 ^b	18,094	JRL	✓	✓
SG00344	26,908	NLP	✓	
SG05755 ^b	29,163	NLP	✓	✓
SG10403	27,419	NLP	✓	
SG14292	26,664	NLP		✓
SG05676	9,704	phospholipase D	✓	
SG14096	13,994	protease inhibitor	✓	
SG18945	640,765	protocadherin fat-like protein	✓	
SG12053	45,595	transglutaminase elicitor	✓	
SG00883	22,153	uncharacterized	✓	
SG03074	18,464	uncharacterized		✓

*反復1と2の両方で同定されたタンパク質

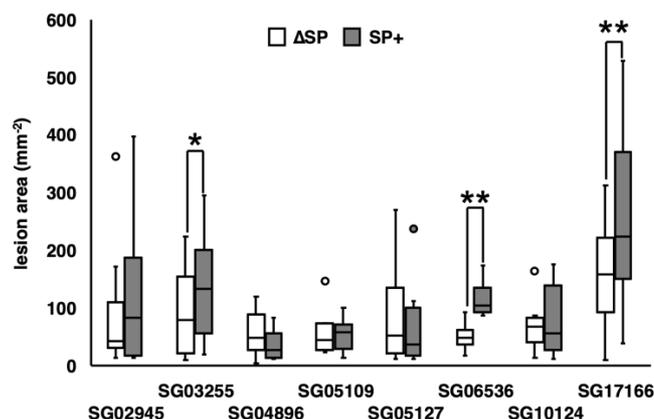


図3 *P. palmivora* の感染に対するJRLの影響。
 Δ SP:シグナルペプチドなし、SP+:シグナルペプチドあり

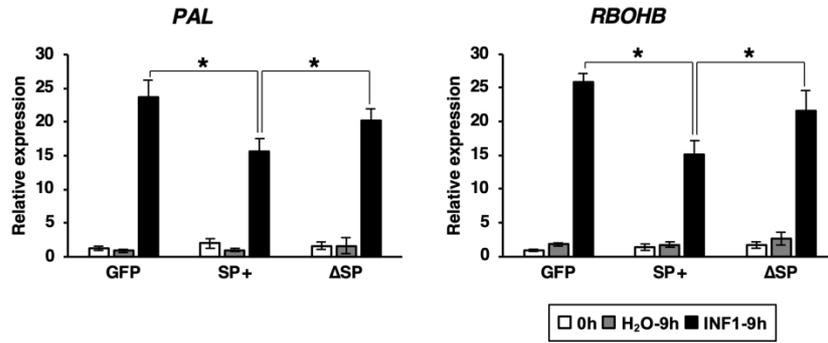


図4 INF1に誘導される防御関連遺伝子発現に対するJRLの影響。
 GFP：コントロール、ΔSP、SP+:それぞれシグナルペプチドなし、ありで
 JRLを発現させた区

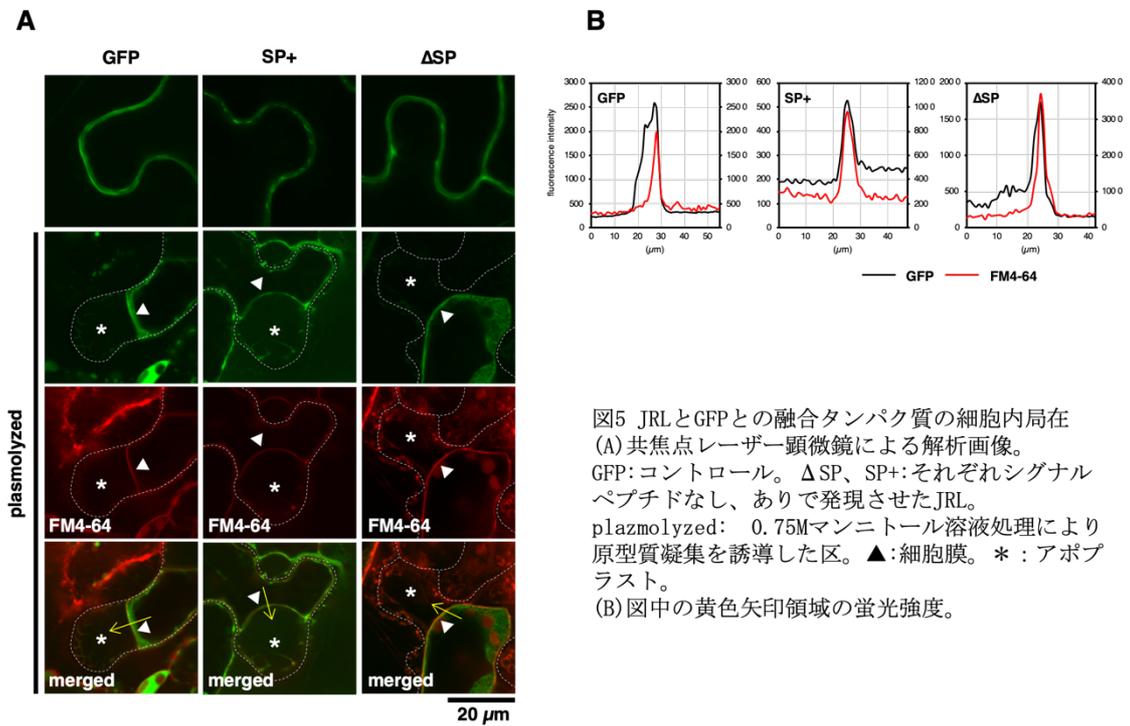


図5 JRLとGFPとの融合タンパク質の細胞内局在
 (A) 共焦点レーザー顕微鏡による解析画像。
 GFP: コントロール。ΔSP、SP+: それぞれシグナル
 ペプチドなし、ありで発現させたJRL。
 plasmolyzed: 0.75Mマンニトール溶液処理により
 原型質凝集を誘導した区。▲: 細胞膜。*: アポプ
 ラスト。
 (B) 図中の黄色矢印領域の蛍光強度。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Fukunaga Kenji, Matsuyama Sarasa, Abe Akira, Kobayashi Michie, Ito Kazue	4. 巻 68
2. 論文標題 Insertion of a transposable element in Less Shattering1 (SvLes1) gene is not always involved in foxtail millet (<i>Setaria italica</i>) domestication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetic Resources and Crop Evolution	6. 最初と最後の頁 2923 ~ 2930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10722-021-01165-w	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 Fukunaga Kenji, Abe Akira, Mukainari Yohei, Komori Kaho, Tanaka Keisuke, Fujihara Akari, Yaegashi Hiroki, Kobayashi Michie, Ito Kazue, Ohsako Takanori, Kawase Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Recombinant inbred lines and next-generation sequencing enable rapid identification of candidate genes involved in morphological and agronomic traits in foxtail millet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04012-1	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 Kobayashi Michie, Utsushi Hiroe, Fujisaki Koki, Takeda Takumi, Yamashita Tetsuro, Terauchi Ryohei	4. 巻 23
2. 論文標題 A jacalin like lectin domain containing protein of <i>Sclerospora graminicola</i> acts as an apoplastic virulence effector in plant-fungus interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 845 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13197	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0件

〔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
---------	---------