

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02995

研究課題名（和文）発病に関わる宿主植物因子の同定と機能解析および応用

研究課題名（英文）Identification, functional analysis and application of host plant factors involved in susceptibility

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・上級研究員

研究者番号：30723580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000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ため、病害防除に貢献しうる遺伝資源として期待される。本研究では、順遺伝学的スクリーニング、および病原菌感染細胞特異的トランスクリプトーム解析を通して、新奇の罹病性遺伝子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

病害防除のため、生産現場では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. In this study, I obtained susceptibility gene candidates through forward genetic approach and cell-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 植物病原菌間相互作用 病害防除

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生産現場では、抵抗性遺伝子による抵抗性品種が利用されてきたが、新レースの出現と抵抗性打破のリスクを常に招いており、新たな遺伝資源を利用した新奇病害抵抗性品種の育成が強く望まれている。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。

これまでに、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた順遺伝学的スクリーニング、および病原菌感染細胞特異的トランスクリプトーム解析を通して、様々な病原菌に対する罹病性遺伝子候補をいくつか得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、新奇の罹病性遺伝子を同定し、新たな耐病性品種の育成を目指すと共に、発病に関わる宿主植物因子である罹病性遺伝子の機能を明らかにすることにより、“植物はなぜ・どのように病気になるのか”という謎を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 順遺伝学的スクリーニングによる罹病性遺伝子候補の同定

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実施した。

(2) 病原菌感染細胞特異的トランスクリプトーム解析による罹病性遺伝子候補の同定

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い、べと病菌が感染している細胞で特異的に発現する宿主遺伝子を見出した。これら、宿主遺伝子はべと病菌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ため、これら候補遺伝子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。

(3) 罹病性遺伝子候補の機能解析

順遺伝学的スクリーニングにより得られた抵抗性変異体の内、べと病菌、炭疽病菌、*Pseudomonas*属菌のいずれに対しても抵抗性を示したHa_13-1は、DNAメチル基転移酵素遺伝子に、およびべと病菌と*Pseudomonas*属菌に対して抵抗性を示したPs_1は、サブチリシン様セリンプロテアーゼ(Subtilase: SBT)遺伝子に変異が見られ、それにより抵抗性が付与されていると考えられた。これら罹病性遺伝子候補の機能を明らかにするため、分子遺伝学・生物学的解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 順遺伝学的スクリーニングによる罹病性遺伝子候補の同定

免疫不全シロイヌナズナ変異体を用いた、べと病菌、炭疽病菌、および*Pseudomonas*属菌に対する順遺伝学的スクリーニングにより、得られていたいくつかの抵抗性変異体において、表現型の確認および他の病原菌に対する抵抗性の評価を行った。

(2) 病原菌感染細胞特異的トランスクリプトーム解析による罹病性遺伝子候補の同定

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宿主遺伝子の内、過剰発現により、べと病菌に対する抵抗性を増進する遺伝子を 2 つ、ならびに罹病性を増進する遺伝子を 1 つ見出していた。手法、および過剰発現個体が抵抗性を示した遺伝子について論文にて報告した (Plant Physiol. 2023 in press)。

過剰発現により罹病性が増進した遺伝子 (罹病性遺伝子候補) は、相同遺伝子が隣接して座乗しており、べと病菌感染時の発現パターンも同様であることがわかった。それぞれの欠損変異体は、べと病菌に対する抵抗性に影響が見られず、冗長性の影響かと考察している。

(3) 罹病性遺伝子候補の機能解析

これまでに、DNA メチル基転移酵素遺伝子に導入された変異により抵抗性が付与されている変異体 Ha_13-1 (*dde2/ein2/pad4/sid2* に付加的な変異の導入) を得ていた。野生型と交配することにより、原因の変異をホモで持ち、かつ *DDE2/EIN2/PAD4/SID2* が野生型に戻っている個体を選抜したところ、免疫機構が活性化され矮性を示し、それが NB-LRR 遺伝子の活性制御に起因することを見出した。

Ps_1 は、分泌型のサブチリシン様セリンプロテアーゼ (SBT) 遺伝子に変異が見られ、SBT のプロテアーゼ活性依存的に宿主植物の罹病性が増進していることを見出した。スクリーニングで得られた SBT の欠損変異株では、病原菌に対する抵抗性に影響が見られなかったため、配列が近い SBT の多重欠損変異株および過剰発現株を作製している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Asai S., Cevik V., Jones D.G.J. and Shirasu K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Cell-specific RNA profiling reveals host genes expressed in Arabidopsis cells haustoriated by downy mildew	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Physiology	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） 10.1101/2023.01.17.524393	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 Berthelie J., Furci L., Asai S., Sadykova M., Shimazaki T., Shirasu K. and Saze H	4. 巻 14
2. 論文標題 Long-read direct RNA sequencing reveals epigenetic regulation of chimeric gene-transposon transcripts in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-38954-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 -
1. 著者名 Kato H., Nemoto K., Shimizu M., Abe A., Asai S., Ishihama N., Matsuoka S., Daimon T., Ojika M., Kawakita K., Onai K., Shirasu K., Yoshida M., Ishiura M., Takemoto D., Takano Y. and Terauchi R.	4. 巻 376
2. 論文標題 Recognition of pathogen-derived sphingolipids in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 857-860
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abn0650	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 Ayukawa Y., Asai S., Gan P., Tsushima A., Ichihashi Y., Shibata A., Komatsu K., Houterman P.M., Rep M., Shirasu K. and Arie T.	4. 巻 4
2. 論文標題 A pair of effectors encoded on a conditionally dispensable chromosome of <i>Fusarium oxysporum</i> suppress host-specific immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02245-4	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 Asai S., Ayukawa Y., Gan P. and Shirasu K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Draft genome resources for Brassicaceae pathogens <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> and <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>rapae</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 1316-1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-06-21-0148-A	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 Ishihama N., Choi S., Noutoshi Y., Saska I., Asai S., Takizawa K., He S.Y., Osada H. and Shirasu K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Oxycam-type non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit NPR1-mediated salicylic acid pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27489-w	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 Matsui H., Nishimura T., Asai S., Masuda S., Shirasu K., Yamamoto M., Noutoshi Y., Toyoda K. and Ichinose Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>tabaci</i> strain 6605, a causal agent of tobacco wildfire disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00405-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00405-21	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.	4. 巻 86
2. 論文標題 Studies on infection mechanisms of oomycete plant pathogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 526-527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-020-00959-7	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 浅井秀太	4. 巻 86
2. 論文標題 卵菌綱植物病原菌の感染機構に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日植病報	6. 最初と最後の頁 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3186/jjphytopath.86.265	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 ゲノムから迫るフザリウムの病原性
3. 学会等名 第21回植物病原菌類談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 ダイコン萎黄病菌の病原性に関するペアエフェクターの同定
3. 学会等名 令和4年度植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 A pair of effectors encoded on a conditionally dispensable chromosome of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> suppress <i>Arabidopsis</i> -specific immunity
3. 学会等名 The International Society for Molecular Plant Microbe Interactions (IS-MPMI) Congress: eSymposia (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 ダイコン萎黄病菌の病原性染色体の同定
3. 学会等名 令和3年度植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 A pair of effectors involving in suppression of Arabidopsis-specific immunity are conserved in Arabidopsis-infecting Fusarium oxysporum
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井秀太
2. 発表標題 ハウレンソウ萎凋病菌の病原性染色体の同定
3. 学会等名 令和3年度植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 病原ゲノミクスによるフザリウム菌土壌診断法	発明者 浅井秀太、ガンバメラ、増田幸子、鮎川侑、白須賢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/041612	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 病原ゲノミクスによるフザリウム菌土壌診断法	発明者 浅井秀太、ガンバメラ、増田幸子、鮎川侑、白須賢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-188346	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
英国	セنزベリー研究所	パース大学		
オランダ	アムステルダム大学			
米国	デューク大学			