

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：24201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22581

研究課題名(和文)植物病原菌におけるユビキチン・プロテアソーム系を介した病原性制御機構の解明

研究課題名(英文)The study of ubiquitin-proteasome system-mediated regulation of pathogenicity in plant fungal pathogens

研究代表者

住田 卓也 (SUMITA, Takuya)

滋賀県立大学・環境科学部・講師

研究者番号：90881136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究で、複数の植物病原菌のユビキチン受容体遺伝子が感染器官の付着器による宿主への侵入と病原性発現に重要であることを見出してきた。本研究では、ウリ類炭疽病菌のユビキチン化タンパク質の運搬に関わるシャトルタンパク質遺伝子の機能解析を行い、宿主侵入および病原性への関与を新たに明らかにした。さらに、シャトルタンパク質間に病原性に関わる役割分担が存在することが示唆された。また、同菌において病原性の低下を示すユビキチン受容体遺伝子の破壊株から生じた病原性復帰変異株のゲノム解析を行い、変異株特有の多型サイトを特定した。変異遺伝子の同定に向け、さらなる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウリ類炭疽病菌においてユビキチンシャトルタンパク質遺伝子が付着器による宿主への侵入および病原性発現に関与することを新たに明らかにした。この知見は、タンパク質の選択的分解による病原性発現制御メカニズムの解明に向けた有用な手がかりとなると考えられる。このような新たな制御メカニズムの解明により、病害防除法や殺菌剤の開発に寄与することが期待できる。また付着器による侵入機構は植物共生菌を含む幅広い分類群の菌類に存在することから、広く菌類と植物の寄生・共生関係の理解の進展につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we showed that disruptants of the ubiquitin receptor gene exhibited impaired host invasion via an appressorium and loss of pathogenicity in two species of plant fungal pathogens. In this study, we showed that an ubiquitin shuttle protein gene is involved in pathogenicity and host invasion in the cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*. The analysis also suggested that two shuttle protein genes of the pathogen play different roles in pathogenicity. In addition, we performed genome analysis of the virulent revertant strains previously isolated from mutant sectors of the ubiquitin receptor gene disruptant, and obtained a list of polymorphic sites specific to revertant strains. Our further analysis is underway to identify mutant genes.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 ユビキチン・プロテアソーム系 付着器 ユビキチンシャトルタンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物病原菌による宿主への「侵入」は感染の成否を左右する重要なプロセスであり、作物保護の観点からそのメカニズムを解明する意義は大きい。多くの病原菌は、「付着器」とよばれる感染特異的な器官を用いて植物に侵入する。付着器侵入過程では、植物の防御システムを抑制・回避するため、病原菌は細胞形態の変化、発病能力に寄与する物質生産などを速やかに、適切なタイミングで行う必要がある。病原菌は限られた資源を用いて、この侵入行動に必要な細胞内成分のタイムリーな再編を実現していると考えられるが、その機構には不明な点が多い。

研究代表者は、分類群の離れた2種の重要病原菌(灰色かび病菌,ウリ類炭疽病菌)において、ユビキチン化されたタンパク質の選択的分解を担うプロテアソームのユビキチン受容体サブユニットである RPN10 ホモログの破壊株が植物への侵入能力を失うことを初めて見出した。本知見から、タンパク質の選択的分解系が感染戦略の違いを超え、付着器侵入に普遍的な機能をもつことが強く示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、ユビキチン・プロテアソーム系(以下UPS)による選択的タンパク質分解を介した植物病原菌の付着器侵入の制御メカニズムを解明するため、植物病原菌の RPN10 ホモログ破壊株の示す侵入能力および病原性低下に関与する病原菌側・宿主側因子の同定を目指した。さらに、植物病原菌のUPS関連因子の付着器侵入プロセスへの関与の解明、UPSを介する侵入メカニズムの普遍性の広がり解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)病原性復帰変異株のゲノム比較解析による変異遺伝子の同定

ウリ類炭疽病菌の RPN10 ホモログ破壊株の培養中に菌系体の一部が突然変異し、病原性および侵入能力が回復した変異株を2株取得している。これら菌株のゲノム配列を次世代シーケンサーで解読して親株である破壊株と比較することで変異遺伝子を同定し、その機能解析を行う。

#### (2)RPN10 ホモログ破壊株の病原性低下に関与する宿主側因子の解明

研究代表者の先行研究により、RPN10 ホモログ破壊株の侵入能力の低下には共通して植物の防御が関与することを示唆する結果が得られている。そこで、灰色かび病菌の野生株および RPN10 ホモログ破壊株をシロイヌナズナ Col-0 に接種し、RNA-Seq 解析によって破壊株接種時に発現が変動する宿主の遺伝子群のリストを明らかにする。

#### (3)病原菌のUPS関連因子の病原性・付着器侵入プロセスへの関与の解明

ウリ類炭疽病菌においてユビキチン化タンパク質の運搬に関与するユビキチンシャトルタンパク質遺伝子の遺伝子破壊株を作出し、病原性および付着器侵入能力への関与について調査する。

#### (4)病原菌のUPSを介する侵入メカニズムの普遍性の広がり解明

宿主侵入におけるUPSの関与の普遍性を明らかにするため、付着器を用いず気孔から侵入するトマト葉かび病菌において RPN10 ホモログの破壊株を作出し、侵入能力への関与について調査する。

### 4. 研究成果

#### (1)病原性復帰変異株のゲノム比較解析による変異遺伝子の同定

ウリ類炭疽病菌の RPN10 ホモログ破壊株および病原性復帰変異株2株について NovaSeq6000 により全ゲノムシーケンシングを行った。得られたシーケンスリードについて NCBI より取得したウリ類炭疽病菌 104-T 株ゲノムデータをリファレンスとして BWA を用いたマッピングを行い、Samtools による多型サイトの抽出を行った。得られた復帰変異株特有の多型サイト約 1400 か所について Python を用いたスクリプトによる解析を行ったが、推定遺伝子コード領域上の多

型サイトの中で翻訳後の配列に変異をもたらすような多型は検出できなかった。今後、遺伝子発現に影響を与えうる ORF 近傍の多型サイトについて、詳細な解析を進めていく予定である。

#### (2)RPN10 ホモログ破壊株の病原性低下に關与する宿主側因子の解明

灰色かび病菌の野生株 HYOG011 株および RPN10 ホモログ破壊株を接種したシロイヌナズナ Col-0 からそれぞれ RNA を抽出し、DNBSEQ G-400 によるシーケンシングを行った。得られたシーケンスリードについて Ensembl Plants から取得したシロイヌナズナのゲノムデータをリファレンスとして HISAT2 によるマッピングを行い、featureCounts によるリードカウントを行った。本解析によって得られた、破壊株接種時に発現量が変動する可能性のある遺伝子のリストには、灰色かび病菌の防御応答に関わると推定される遺伝子が含まれており、今後 RT-qPCR により個別の遺伝子について詳細に解析する予定である。

#### (3)病原菌の UPS 關連因子の病原性・付着器侵入プロセスへの關与の解明

ウリ類炭疽病菌ゲノムから出芽酵母のユビキチンシャトルタンパク質 RAD23 および DSK2 のホモログを同定し、相同組換え法によりそれぞれの遺伝子破壊株を作出した。宿主キュウリへの接種試験において、RAD23 ホモログ破壊株は病原性の低下を示し、付着器侵入に一定の低下を示した。RAD23 ホモログ破壊株はその他にもコロニー生育速度の低下、分生子形成の低下を示し、菌叢の態様は RPN10 ホモログ破壊株と類似していたが、RPN10 ホモログ破壊株と比べるといずれの調査項目においてもマイルドな表現型を示した。一方、DSK2 ホモログ破壊株は野生株と同様の病原性および付着器侵入能力を示した。これらの結果から、病原性や形態形成に関わるユビキチンシャトルタンパク質の機能的役割分担の存在が示唆された。また、RAD23 と RPN10 の制御する病原性や形態形成に關連する経路は共通する可能性が考えられた。

#### (4)病原菌の UPS を介する侵入メカニズムの普遍性の広がり解明

トマト葉かび病菌ゲノムから RPN10 ホモログを同定して遺伝子破壊ベクターを構築し、野生株 CF301 に導入して相同組換え法による遺伝子破壊を試みた。現在までに破壊株の取得には至っておらず、実験を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------