

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20579

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の子嚢胞子形成におけるセプチンおよびその制御因子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of septin and its regulators in ascospore development of phytopathogenic filamentous fungi

研究代表者

辻 健也 (Tsuji, Kenya)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：10965940

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）：先行研究によって申請者は病原糸状子嚢菌トウモロコシごま葉枯病菌 *Bipolaris maydis* を用いて子嚢内における蛍光タンパク質を用いた局在解析法を開発した。本研究ではエイソソームタンパク質が子嚢胞子形成に必須であり、蛍光観察の結果からエイソソームタンパク質の局在はセプチン Cdc10 の局在と類似することも明らかにした。その他 SNARE タンパク質や Phospholipase D などが正常な子嚢胞子形成に必須であることを明らかにした。またセプチン Cdc10 が栄養成長時と子嚢胞子形成時でその構造が変化している可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では病原糸状子嚢菌の有性生殖における子嚢の発達から子嚢胞子形成までの段階的な RNA-seq 解析を実施した。このデータは子嚢胞子の発生メカニズムを理解するための重要な手掛かりになると考えている。また、植物病原菌にとって有性生殖は新たな薬剤抵抗性および病原力の獲得のきっかけとなるだけでなく、主要な分散減として機能している場合も存在する。そのため、新たな植物防除法の開発にも寄与すると考えている。

研究成果の概要（英文）：In a previous study, the localization analysis method using fluorescent protein in the asci of the phytopathogenic filamentous fungi *Bipolaris maydis* has been established. In this study, we also found that eisosome protein is essential for the ascospore formation and that the localization pattern of eisosome protein is similar to that of core septin Cdc10 based on fluorescence observation. In addition, SNARE protein and phospholipase D were found to be essential for normal ascospore formation. We also showed that the structure of core septin Cdc10 may change during vegetative growth and during ascospore formation.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 有性生殖 子嚢胞子 MSUD セプチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌にとって有性生殖は新たな薬剤抵抗性および病原力の獲得のきっかけとなっていると考えられている。また有性胞子が新たな分散・感染源として主要な役割を持つ場合も存在する。ゆえに、植物防除の観点から見て有性生殖は重要なイベントである。病原菌の中でも、植物病原菌が多く含まれる糸状子嚢菌は有性胞子(子嚢胞子)を子嚢と呼ばれる特殊な細胞内で発達させることが知られている。申請者はこれまでに分子遺伝学的手法を用いて子嚢胞子形成に関与する因子について研究を行ってきた。特に、付着器内で高次構造を形成し小胞輸送因子の足場を作るセプチンが、子嚢胞子の形態形成に大きく関与していることを見出した。さらに、他の研究でも有性胞子形成に関与する遺伝子が複数同定されている。しかし、子嚢内で生じる子嚢胞子形成は試薬を用いた染色による観察が難しい。また、タンパク質の局在を可視化する方法として一般的に使用されている蛍光タンパク質も、糸状子嚢菌の子嚢内では蛍光を示さない場合が存在することも報告されている。そのため、子嚢内部におけるセプチンなど多数の因子の局在や詳しい機能については知見が乏しい。申請者は植物病原菌トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris maydis*) において、この蛍光タンパク質の蛍光不全是 MSUD (meiotic silencing by unpaired DNA) であることが明らかとなった。また、MSUD を抑制することにより子嚢内の蛍光タンパク質を用いた蛍光観察が可能になり、子嚢内のセプチンの蛍光観察に成功した。この観察によりセプチンは子嚢内において発生途中の子嚢胞子膜近傍に局在を示し、菌糸内とは異なる特有の高次構造を形成することを示した。

2. 研究の目的

糸状子嚢菌の子嚢胞子発生メカニズムはその解析の困難さから知見が乏しいのが現状である。申請者の先行研究により、蛍光タンパク質を用いた蛍光観察が可能になったことから、今まで明らかにされなかった子嚢胞子形成に重要な因子の局在解析が行えるようになった。またセプチンの欠損が子嚢胞子の形態異常を引き起こすことを見出し、セプチンが発生途中の子嚢胞子膜近傍に局在を示しことに加え、菌糸内とは異なる特有の高次構造を形成することを示した。これらの結果から、この子嚢内の特有の高次構造の制御を明らかとすれば、子嚢胞子がどのように形成されるのかを明らかにする手掛かりになると考えた。そこで本研究では、子嚢胞子形成に関与する因子とセプチンの制御因子の探索およびそれら因子の蛍光観察による局在解析により、子嚢胞子発生の分子メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子の破壊

出芽酵母や分裂酵母、他の糸状子嚢菌において子嚢胞子形成に関与する遺伝子を query として本菌のゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行い、それらのホモログを探索する。そして、遺伝子破壊によって候補遺伝子の破壊株を作出する。野生株との交配試験を行い、子嚢胞子形成への関与を確認する。子嚢胞子形成に異常が見られた破壊株に対して、蛍光タンパク質遺伝子を融合した野生型候補遺伝子を導入し、相補株を得る。MSUD を抑制する株との交配を行い、子嚢内における候補遺伝子の局在解析を行う。今回は特に出芽酵母および分裂酵母の子嚢胞子形成時において子嚢胞子膜の伸長部位の先端に局在するタンパク質である LEP (leading-edge protein) に着目した。

(2) セプチン蛍光株を子嚢胞子発生マーカーとして使用するための基盤作り

子嚢胞子形成時におけるセプチンの局在を観察するためには MSUD を回避する必要がある。その方法の一つは MSUD 抑制株を使用することである。しかしこの手法では、MSUD の抑制により他の遺伝子破壊の影響がマスクされてしまう可能性がある。つまり、遺伝子破壊による子嚢胞子形成への影響をセプチンの蛍光可視化したまま観察できない可能性がある。その解決策として、セプチンの蛍光株同士の交配により、MSUD を回避する方法がある。そのためには交配型因子の異なるセプチン蛍光株を作出する必要がある。交配型因子の異なるセプチン蛍光株は、蛍光株と MSUD 抑制株とを交配し、子孫分離によって得る。

(3) RNA-Seq による子嚢胞子形成時におけるセプチンの制御因子の探索

子嚢胞子形成時におけるセプチンの制御因子の探索を行うために、交配によって形成される偽子嚢殻から RNA を抽出し、RNA-seq を実施する。そして、菌糸形成時と比較して、子嚢胞子発生時のみ発現するもしくは発現が上昇する遺伝群のデータを手に入れる。

4. 研究成果

(1) 子嚢胞子形成に関与する因子の子嚢内における局在解析

出芽酵母の LEP を query として *B. maydis* のゲノムデータベースに対して BLAST 検索を行った結果、それらホモログを見出すことはできなかった。一方で分裂酵母の LEP であるエイソソームタンパク質 Meu14 では高い相同性を示す 2 つのタンパク質が見いだされた。この 2 つを Pi11 および Pi12 とした。それぞれの破壊株を作出し交配試験に供した結果、 $\Delta pi12$ と野生株の交配では子嚢胞子が形成されなかった。この結果から、Pi12 は子嚢胞子形成に必須だと考えられた。子嚢胞子形成における Pi12 の局在を観察するために、*PIL2-mCherry* 株を作出した。本株と MSUD 抑制株との交配の結果、子嚢内において蛍光が認められた。初期において子嚢内に全体に蛍光が認められたが、その後子嚢の上部に強い蛍光が観察された。この蛍光パターンはセプチンと同様であった。子嚢胞子の発生が始まると子嚢胞子膜のみならず子嚢胞子全体に蛍光が認められた。またこの結果は、両酵母で見られる LEP とは異なる箇所局在していた。この結果は、糸状菌における LEP と類似した機能を持つタンパク質はほかに存在する可能性を示している。また、子嚢内での蛍光が認められたことから、申請者が開発した蛍光観察法はセプチン以外にも利用できるということが再確認できた。その他にも本菌における Hydrophobin は子嚢胞子形成に必須ではないこと、SNARE タンパク質や Phospholipase D は正常な子嚢胞子形成に必須であることを明らかにした。

(2) セプチン蛍光株を子嚢胞子発生マーカーとして使用するための基盤作り

交配型因子の異なるセプチン蛍光株を得るために、セプチン蛍光株 (*MATI-2*) と MSUD 抑制株 (*MATI-1*) を交配し、単胞子分離を行った。次に薬剤による選抜をして、複数の交配型因子の異なるセプチン蛍光株 (*MATI-1*) を作出した。複数パターンの蛍光株同士の交配試験の結果、すべての交配パターンで子嚢胞子の形態異常が観察された。本蛍光株はセプチン *CDC10* 遺伝子の C 末端に *eGFP* 遺伝子が融合している。C 末端への *eGFP* の融合は *CDC10* の正常な機能の妨げになっている可能性があることが明らかとなった。しかし、 $\Delta cdc10$ 株への *CDC10-eGFP* カセットの導入は栄養成長における機能の相補を可能にしている。このためこの機能阻害は有性生殖時限定的だと考えられる。この結果は、セプチン *CDC10* が有性生殖時において栄養成長時とは異なる構造を取る可能性を示しているのかもしれない。

(3) RNA-Seq による子嚢胞子形成時におけるセプチンの制御因子の探索

適切な子嚢胞子の発達段階において RNA を抽出するために、交配開始から偽子嚢殻、子嚢および子嚢胞子の成熟を観察した。交配開始から 7 日ほどで偽子嚢殻の原基が確認できた。その後、10 および 11 日目には偽子嚢殻内に鍵状構造が認められた。12 および 13 日目には肥大化した子嚢が観察された。14 および 15 日目には肥大化した子嚢内部に発生途中の子嚢胞子が多く認められた。16 および 17 日目には子嚢内部の子嚢胞子は螺旋を描いており、成熟した様子が観察された。これらの観察結果から、RNA 抽出には 11、13、15 および 17 日目の偽子嚢殻を使用することにした。また、比較として液体培地で分生子を 24 時間振盪培養して得られた菌糸からも RNA も抽出した。各サンプルの RNA-seq は終了したが、ゲノムに対してのマッピングおよびサンプル間の比較解析には至っておらず、現在引き続き行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻健也, 佐波雅史, 寺内裕貴, 吉見啓, 田中千尋, 本田与一, 河内護之
2. 発表標題 Bipolaris maydisの菌糸表面疎水性におけるハイドロフォビンの関与についての調査
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenya Tsuji, Akira Yoshimi, Masafumi Saba, Yuki Terauchi, Moriyuki Kawauchi, Yoichi Honda, Tanaka Chihiro
2. 発表標題 Functional analyses of substances related to hyphal hydrophobicity in Bipolaris maydis
3. 学会等名 16th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻健也, 野村亜美, 吉見啓, 田中千尋
2. 発表標題 Bipolaris maydisにおけるSeptin Cdc10の局在解析
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学大会
4. 発表年 2024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
---------	---------