

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：24405

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20583

研究課題名（和文）真菌界における植物病原性獲得の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Decoding the molecular basis of phytopathogen evolution in the fungal kingdom

研究代表者

津島 綾子（Tsushima, Ayako）

大阪公立大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：50965077

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）：真菌界において植物病原体というライフスタイルへの適応がどのように起こったのかはほとんどわかっていない。本研究は植物病原性獲得の根本に関わる新奇因子の発見を目的として、植物病原真菌に特徴的な遺伝子の探索と機能解析を行なった。その結果、植物病原子の菌間で特異的に保存された6BP-2遺伝子を恒常発現する*Colletotrichum higginsianum*の病原性が低下傾向を示すことを明らかにした。このことから、6BP-2は病原性に必要な一方、植物は6BP-2を認識し防御応答を誘導しているのではないかと新しい仮説が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物病原性を示す子の菌のゲノム上に特異的に保存された6BP-2遺伝子の機能解析を行なった。その結果、この遺伝子を恒常的に発現するモデル植物病原子の菌は野生型に比べ病原性が低下する傾向にあることを明らかにした。これにより、6BP-2遺伝子が病原性に重要な一方、植物は病原菌が共通にもつ因子を認識し防御応答を誘導しているのではないかと新しい仮説が得られた。今後、6BP-2の機能をさらに詳細に明らかにできれば、植物-病原体間の共進化に関する理解が深まるだけでなく、新たな植物保護技術への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：It remains unclear how certain fungal species have adapted to plant pathogenic lifestyle. This study aimed to identify novel elements that are relevant to acquisition of plant pathogenicity in the fungal kingdom. For this, we explored and functionally characterized genes that are unique to plant pathogenic fungi. Our analyses found that *Colletotrichum higginsianum* transformants constitutively expressing 6BP-2 gene, which is specifically conserved among plant pathogenic ascomycetes, tend to show reduced pathogenicity. This brought us a new working hypothesis that plants may recognize 6BP-2 and induce defence responses while 6BP-2 is also necessary for phytopathogenicity in fungi.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原真菌 比較ゲノミクス オルソグループ *Colletotrichum* 恒常発現株

1. 研究開始当初の背景

これまでに記載された真菌およそ 10 万種のうち、約 2 割が植物病原性を示すと推定されている[1]。これらの植物病原真菌は、担子菌門および子囊菌門を中心に系統樹上で繰り返し現れる[2]。これまでに多数の植物病原真菌のゲノムが解読され、それを利用した比較ゲノム解析が盛んに行われてきた。しかし、これらの研究の多くは、異なる宿主範囲や養分の摂取様式に着目し、近縁の植物病原真菌同士を比較している[3, 4]。従って、植物病原真菌の個々のニッチへの適応に関する理解は進んでいるが、その前段階、つまり真菌はどのように植物病原性を獲得したのか、については不明な点が多く残されている。これを踏まえ、申請者は本研究で扱う学術的問いを、多様な植物病原真菌の進化に重要な役割を果たした因子は何か、に設定した。

申請者は植物炭疽病を引き起こす *Colletotrichum* 属菌に共通する病原性因子の同定を目的に、24 種の子囊菌ゲノムの比較解析を行った[5]。この解析では、当初想定していなかった植物病原子囊菌に特異的な遺伝子、6BP-2 も見出された。過去の RNA-seq 解析により *Colletotrichum higginsianum* (*Ch*) の 6BP-2 は感染初期に発現が誘導されることが報告されているが[6]、*Ch* を含む植物病原子囊菌が持つ 6BP-2 遺伝子の機能は不明である。NCBI が管理するゲノムデータベースの情報量は年 40% 程の成長を続けており[7]、現在では 1 万以上の真菌ゲノムが利用可能になっている。膨大なゲノムリソースを活用し、対象を広げて解析を行えば、植物病原真菌を特徴づける因子をより高精度に推定できると考え、本研究を着想した。

本研究と同様に、植物病原性の進化に着目した糸状菌の比較ゲノム解析は既に行われている。その先駆けの一つに、Soanes らによる研究が挙げられる[8]。この研究は 36 種の植物病原糸状菌ゲノムを比較し、6BP を含む複数の遺伝子群について植物病原真菌特異的なコピー数の増大を明らかにした。近年では 100 種以上の真菌ゲノムを使った解析も珍しくないが、その多くは Soanes らと同様、配列ベースの研究に留まっている[9, 10]。大規模解析と遺伝子機能の検証を両立した数少ない例として、112 個の真菌ゲノムの比較解析により植物病原真菌に特異的なペクチン分解酵素がシロイヌナズナの生育を抑制することを示した研究がある[11]。この研究はシロイヌナズナ根圏の微生物叢を構成する真菌を対象に行われたが、本研究は真菌界全体に共通する植物病原性の決定因子を明らかにすることを目的としており、両者の着眼点は異なる。本研究は、様々な植物に感染する植物病原真菌を含めた解析を行い、植物病原性獲得の根本に関わる新奇因子の発見を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、真菌の植物病原性の獲得に不可欠な因子を推定し、その感染への寄与を実験的に検証することである。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、以下の解析・実験を行なった。

- (1) 真菌界における 6BP-2 遺伝子の保存パターン解析
公共データベースを利用し、6BP-2 遺伝子の保存パターンを 249 種の真菌ゲノムに対して調査した。
- (2) 恒常発現株を用いた感染実験
モデル植物病原真菌の *Ch* を用いて *Ch*6BP-2 恒常発現株を作出し、シロイヌナズナに対する病原性の影響を調査した。
- (3) 新たな比較ゲノム解析手法の検証
大量の配列情報を比較する手法として、k-mer を用いた配列プロファイリングに着目し、その有用性をコムギ赤さび病菌のゲノム配列を用いて試験した。

4. 研究成果

- (1) 研究の主な成果
真菌ゲノムにコードされた遺伝子の保存性をまとめたデータベース Gcorn fungi[12]を利用し、6BP-2 遺伝子の保存パターンを調査した。その結果、解析に用いた 249 の真菌ゲノムのうち、ゲノム上に 6BP-2 ホモログを有するのは 32% であった。植物病原菌とされる種では 68% が 6BP-2 ホモログを有していたのに対し、哺乳類の病原菌とされる種で 6BP-2 ホモログを持つのは 23% であった。以上より、6BP-2 遺伝子は多くの植物病原真菌ゲノムに保持されている傾向にあり、先行研究で着目した子囊菌類だけでなく担子菌類でも 6BP-2 遺伝子の有無と植物病原性の表現型との間に関連が見られることがわかった。一方で、真菌のライフスタイルは多様かつ連続的であり、どの種を植物病原菌としてみなすのか、といったライフスタイルによる分類の基準設定が難しいという課題も明らかになった。今回は自身による文献調査の結果を基にライフスタイルの分類を行なったが、今後は FUNGuild[13] に代表される生態的地位のアノテーションに特化したツールを利用することも検討したい。
シロイヌナズナに感染する *Ch* はモデル植物病原真菌として多くの研究に用いられて

いる。イギリスから帰国後の新しい環境で研究をスタートさせるため、まず農研機構 農業生物資源ジーンバンクより取り寄せた菌株の培養環境を整備した。また、宿主植物となるシロイヌナズナも理研 バイオリソースセンターから取り寄せ、栽培環境を整えた。さらに、*Ch* の病斑が安定的に形成される条件を検討し、接種実験系の立ち上げも行った。次に、Tsushima et al. 2021[5]に従ってアグロバクテリアを用いた *Ch* の形質転換を行い、5 つの *Ch6BP-2* 恒常発現株を得た。qRT-PCR による発現量解析により、液体培養条件下で全ての恒常発現株が野生型より *Ch6BP-2* を高発現していることを確認した。これらの恒常発現株を用いて接種実験を行ったところ、5 つ中 2 つの菌株が野生型に比べて病原性が有意に低下していることを明らかにした。*Ch6BP-2* 恒常発現株の病原性低下が感染のどの段階で起きているのか、より詳細に解析するため、菌糸侵入が起こる感染初期に着目し、侵入率測定に適した感染実験系の条件検討を行った。接種後の *Ch* 菌糸を経時観察し、侵入菌糸の観察に適したタイムポイントを見出すことができた。今後、この実験系を用いて接種試験を行い、*Ch6BP-2* 恒常発現による病原性の低下がどのように起こるのか調べる予定である。

近年、大量のゲノム情報を比較する手法として、*k-mer* による配列プロファイリングが注目されている。この手法の有用性を検証するため、コムギ赤さび病菌を題材として解析を行った。その結果、感染の可否と有意に関連する配列の同定に成功した。今回は種内変異の同定にこの手法を用いたが、今後、真菌界全体を対象とした比較解析にも応用できるかもしれない。この場合には、多様な配列の集合に適したパラメーターを検討する必要があると思われる。

(2) 得られた成果の位置付けとインパクト

本研究における特に重要な成果は、*Ch6BP-2* 恒常発現株の複数のラインで病原性低下の表現型を見出したことである。これは、植物病原真菌に保存された遺伝子は病原性に必須な遺伝子だろう、という研究開始当初の仮説とは反対のデータである。植物は微生物が共通に持つ分子パターンを認識し、病原体に対する免疫を誘導するシステムを有することはよく知られている[14]。このことと今回の実験結果を踏まえ、*6BP-2* をはじめとする植物病原菌に特徴的な遺伝子は病原性に関わるだけでなく、植物がそれを認識し身を守っているのではないか、という新たな作業仮説が得られた。今後、*6BP-2* の機能をさらに明らかにできれば、植物-病原体間の共進化に関する理解が深まるだけでなく、新たな植物保護技術への応用も期待できる。

(3) 今後の展望

本研究により、植物病原性の獲得と同じ進化軌道を示す *6BP-2* 遺伝子が、植物-病原体相互作用に関係している可能性が示唆された。今後、*Ch6BP-2* が機能する感染ステージを解明するため、本研究期間中に最適化した実験系で侵入率の測定を行う予定である。また、今回の研究を通じて新たに得られた *Ch6BP-2* が植物の防御応用を誘導しているのかという問いについても、植物の防御関連遺伝子の発現や活性酸素種の蓄積を調査することで明らかにしていきたい。今回の実験結果から、*6BP-2* 遺伝子と似た進化軌道を示す他の遺伝子も植物への感染に重要な役割を持っている可能性が考えられた。*6BP-2* 遺伝子のさらなる機能解析と並行して、植物病原性の表現型と共起関係にあるオルソグループの探索も続けていきたい。その際には、*k-mer* を用いた配列プロファイリング手法も活用できると考えている。

<引用文献>

1. Hawksworth DL, Lücking R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*. 2017;5.
2. Zanne AE, Abarenkov K, Afkhami ME, Aguilar-Trigueros CA, Bates S, Bhatnagar JM, et al. Fungal functional ecology: bringing a trait-based approach to plant-associated fungi. *Biological Reviews*. 2020;95:409–33.
3. Ma LJ, Van Der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*. 2010;464:367–73.
4. Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:9166–71.
5. Tsushima A, Narusaka M, Gan P, Kumakura N, Hiroyama R, Kato N, et al. The Conserved *Colletotrichum* spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:682155.
6. O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*. 2012;44:1060–5.
7. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2019;47:D94–9.
8. Soanes DM, Alam I, Cornell M, Wong HM, Hedeler C, Paton NW, et al. Comparative Genome Analysis of Filamentous Fungi Reveals Gene Family Expansions Associated with Fungal Pathogenesis. *PLOS ONE*.

2008;3:e2300.

9. Miyauchi S, Kiss E, Kuo A, Drula E, Kohler A, Sánchez-García M, et al. Large-scale genome sequencing of mycorrhizal fungi provides insights into the early evolution of symbiotic traits. *Nature Communications*. 2020;11:1–17.
10. Romero-Olivares AL, Morrison EW, Pringle A, Frey SD. Linking Genes to Traits in Fungi. *Microbial Ecology*. 2021;82:145–55.
11. Mesny F, Miyauchi S, Thiergart T, Pickel B, Atanasova L, Karlsson M, et al. Genetic determinants of endophytism in the *Arabidopsis* root mycobiome. *Nature Communications*. 2021;12:1–15.
12. Kawachi T, Inuki Y, Ogata Y. Gcorn fungi: A web tool for detecting biases between gene evolution and speciation in fungi. *Journal of Fungi*. 2021;7.
13. Nguyen NH, Song Z, Bates ST, Branco S, Tedersoo L, Menke J, et al. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*. 2016;20:241–8.
14. Wang Y, Pruitt RN, Nürnberger T, Wang Y. Evasion of plant immunity by microbial pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20:449–64.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ayako Tsushima, Amelia Hubbard, Grzegorz Czajowski, Pawel Czembor, Diane G.O. Saunders |
| 2. 発表標題 Identifying genetic determinants for virulence in the wheat leaf rust pathogen using k-mer GWAS analysis |
| 3. 学会等名 2023 IS-MPMI Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口龍真, 藏本亞理紗, 青木 考, 津島綾子 |
| 2. 発表標題 植物病原子嚢菌に保存されたSB2遺伝子を過剰発現するColletotrichum higginsianumの病原性は低下傾向を示す |
| 3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryushin Yamaguchi, Arisa Kuramoto, Koh Aoki, Ayako Tsushima |
| 2. 発表標題 Constitutive expression of a phytopathogenic ascomycete-associated gene tends to suppress infection of Colletotrichum higginsianum |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会第65回年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 津島綾子, Amelia Hubbard, Grzegorz Czajowski, Pawel Czembor, Diane G.O. Saunders |
| 2. 発表標題 コムギ赤さび病菌の病原性決定因子同定に向けたk-mer GWAS解析 |
| 3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2023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 | | | |
|---------|-------------------|------|--|--|
| 英国 | John Innes Centre | NIAB | | |
| ポーランド | IHAR-PIB | | | |