

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860478

氏名

大津美奈

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Norwich（ノリッジ）（国名：英国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

菌感染戦略に着目したプラズモデスマータを介する細胞間コミュニケーション機構の解明

3. 派遣期間：平成 31 年 2 月 1 日 ～ 令和 3 年 6 月 5 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： John Innes Centre

部局名： Crop Genetics Department

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 研究・調査実施状況

### <研究目的>

多細胞生物は、進化の過程で細胞間コミュニケーションに重要な様々な細胞構造を発達させ、細胞の集合体が1つの個体として機能することを可能にしてきた。細胞全体が細胞壁で覆われている植物では、原形質連絡 (PD) と呼ばれる、細胞壁を貫いて細胞同士を連結する微小なチャンネルが重要な役割を果たしており、近年、PD を介した小分子の輸送は、植物の生命維持に関与する多くの現象にとって必須であることが明らかになってきた。さらに、受け入れ研究先の Faulkner 研究室は病原菌に対する初期の免疫応答には、PD の閉鎖が重要であることを明らかにしている [1, 2, 図 1]。しかし、PD 制御機構をリアルタイムに評価する解析法は確立されていないため、細胞間コミュニケーションの根幹を担い、環境応答に応じてダイナミックに変化する PD の分布や密度、開度など時空間的な PD 動態は、現在までほとんど明らかになっていない。

植物病原菌が分泌するエフェクターは、植物細胞内において植物のシグナル伝達に干渉することで、感染に有利な表現型を宿主細胞に誘導することが分かっている。先行研究において、イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の菌糸が植物細胞感染時に PD を通過すること、またある一つのエフェクター遺伝子をノックアウトしたいもち病菌は、感染した細胞から PD を介してその隣の細胞へ移動することができなくなり、病原性が減少することが明らかになっている [3]。病原菌のエフェクターは、宿主植物の挙動を真似て、植物の情報伝達をハイジャックすることが多いため、このようなエフェクターは、PD 機能調節の鍵となる宿主植物の因子を標的とすることが予想される (図 1)。

本研究では、病原菌エフェクターをツールとして用いた植物の PD 制御を担う鍵因子の同定およびその機能解析によって、植物の PD ダイナミクスの時空間的な制御メカニズムの解明を最終目的とする。そのために、生細胞で PD 動態をリアルタイムに捉えられるイメージング系を新たに確立する。そして、PD 動態をターゲットとする病原菌エフェクターおよび、植物内での標的因子を同定し、変異体において PD ダイナミクスを時空間的に評価する。

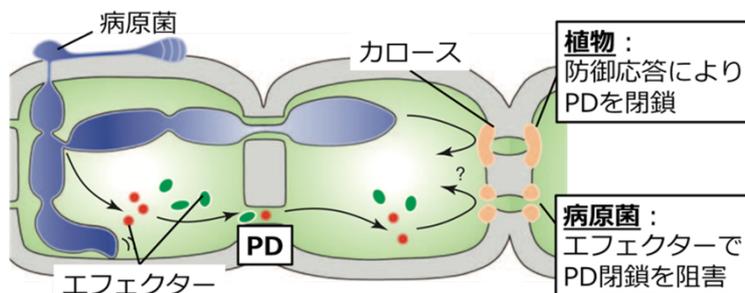


図 1 植物と病原菌のPD制御を巡る攻防の模式図

### <研究内容・研究方法>

本研究では、植物の PD ダイナミクスの時空間的な制御メカニズムの解明のため、以下のことを行った。

1. PD 動態を解析するモデル実験系となる植物と微生物、およびエフェクター候補遺伝子の選出
2. エフェクター候補を効率的に選抜するための顕微鏡を用いたスクリーニング系の確立
3. ライブセルスクリーニング系を用いた PD 関連エフェクター候補の探索
4. エフェクター恒常発現形質転換体を用いた網羅的な遺伝子発現解析

## 1. PD 動態を解析するモデル実験系となる植物と微生物、およびエフェクター候補遺伝子の選出

### 1-1. モデル実験系となる植物と微生物の選出

本研究では、PD 動態を解析するのに適した病原菌として、病原菌としてアブラナ科植物炭そ病菌 (Ch; *Colletotrichum higginsianum*) を選出した。これは、Ch がいもち病菌と同様に、宿主植物感染時には PD を介して細胞間を移動することから、PD 制御を攪乱するエフェクターを宿主植物内に分泌すると推測されたためである。また、Ch はゲノム情報が公開されているだけでなく、形質転換方法が整っているため、エフェクターの過剰発現株や機能欠損株を作出することが可能である。さらに、Ch はモデル植物であるシロイヌナズナに感染することができるため、イネに感染するいもち病菌と比較して、エフェクターと相互作用する宿主植物因子の機能解析をスムーズに行うことができる。以上のことから、Ch およびシロイヌナズナを用いる実験系は PD 動態を解析するための最適なモデル実験系といえる。

## 1-2. ゲノム情報および発現解析データを用いたエフェクター候補遺伝子の選出

Ch は、いもち病菌と同様に半寄生性の植物病原菌であり、感染初期は生きた植物細胞において寄生関係にあるが (Biotrophic phase)、感染後期には植物細胞を殺して感染を拡大し、栄養を獲得する (Necrotrophic phase)。O'Connell らの先行研究によって、培地上、Biotrophic phase、および Necrotrophic phase に、Ch の遺伝子発現がどのように変動するのかについてトランスクリプトーム解析によって網羅的に調べられた [4]。まず、本研究では、その網羅的な発現解析データを用いてエフェクター候補となる遺伝子の絞り込みを行った。植物の細胞間コミュニケーションに影響を及ぼすエフェクターは、生きた植物細胞の PD 制御メカニズムをハイジャックしていると考えられるため、本研究では培地上および Necrotrophic phase ではほとんど発現しておらず、Biotrophic phase にのみ発現する遺伝子に着目した。また、本研究においては機能未知の遺伝子を中心に解析を行いたいと考えたため Ch のゲノムデータベース (<http://fungi.ensembl.org/index.html>) を元に機能が推定されるもの (トランスポーターなど) を除外した。さらに、エフェクターとして植物細胞で機能するためには、分泌シグナルとなるアミノ酸配列が必要不可欠である。そこで、発現解析データによって絞り込まれた候補遺伝子の全長アミノ酸配列をゲノムデータベースから検索し、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) を用いて分泌シグナルの有無を判別した。その結果、50 遺伝子が分泌シグナルを持つエフェクター候補遺伝子として見出された。

## 2. エフェクター候補を効率的に選抜するための顕微鏡を用いたスクリーニング系の確立

PD 制御に関連するエフェクター候補としてまず挙げられるのは、PD の構造および機能に直接的に影響を及ぼす可能性の高い “PD 局在性エフェクター” である。また、興味深いことに、当研究室ではいくつかの病原菌のエフェクターが細胞間移行することを明らかにしている (データ未発表)。その細胞間移行するエフェクターの中で、他の同程度のサイズのエフェクターよりも速く移動するものがあれば、それらの Hyper Mobile エフェクターは、PD サイズを変化させることで自身の細胞間移行を促進していると考えられる。そこで、本研究では宿主植物の PD 制御に関連するエフェクターとして以上の二つ、1) PD 局在性エフェクターと 2) Hyper Mobile エフェクターをまず探索することとした。

1-2.において選出した 50 のエフェクター候補の中から 1) または 2) に当てはまるエフェクターを探索するためには、エフェクターの局在と細胞間移行を同時に評価できるスクリーニング系が必要である。そこで、2-in-1 コンストラクトを用いたライブセルスクリーニング系を確立した。2-in-1 コンストラクトには、eGFP 融合したエフェクター遺伝子を発現させるカセット (35Sp::effector-eGFP) と、核局在シグナルを融合した Tomato を発現させるカセット (35Sp::NLS-Tomato) の二つのカセットが含まれている。この NLS-Tomato を含むカセットは、エフェクターを融合したエフェクターが移動性を持つかどうかを判別するための形質転換マーカーである。NLS-Tomato は通常核に蓄積し、細胞間を移行することがないため、赤色蛍光と緑色蛍光の両方見られる細胞は形質転換された細胞、そして緑色蛍光のみ見られる細胞は、形質転換された細胞ではなく、エフェクターが移動した細胞と判別できる。

まず、このコンストラクトが機能するかどうかを判別するため、細胞間を移動するコントロールとして free eGFP および、細胞間を移動しないコントロールとして eGFP をタンデムにつないだもの (2xeGFP) を用いて 2-in-1 コンストラクトを作製し、アグロバクテリウムを用いてベンサミアナ葉に一過的に発現させた。この時、単一の形質転換細胞を得るため、非常に低濃度 ( $OD_{600} = 1.0 \times 10^{-4}$ ) のアグロバクテリウムを用いた。そして、3 日後のベンサミアナ葉を共焦点顕微鏡 (Zeiss; LSM800) により観察し、この実験系が細胞間移行の評価に適しているかどうかを調べた (図 2)。eGFP のみを発現させた細胞では、NLS-Tomato の赤色蛍光が見られる形質転換細胞だけでなく、周辺の細胞でも eGFP の緑色蛍光が観察されたことから、eGFP が PD を介して拡散している様子が観察された。一方、2xeGFP を発現させた細胞では、緑色蛍光および赤色蛍光は形質転換された単一の細胞のみで観察され、以上の結果から、この 2-in-1 コンストラクトを用いたライブイメージング系を用いることによって、エフェクターの局在だけでなく、細胞間移行の有無も同時に判別することが可能になった。

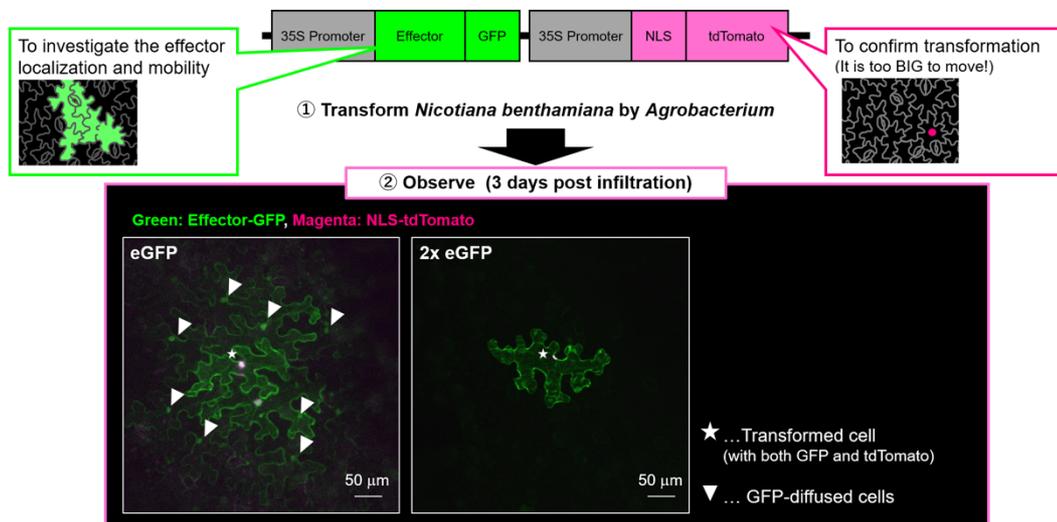


図 2. 2-in1 コンストラクトを用いたライブセルスクリーンシステム

### 3. ライブセルスクリーニング系を用いた PD 関連エフェクター候補の探索

1-2.で見出した 50 の候補遺伝子を遺伝子合成し、2. で確立した 2-in-1 コンストラクトを作製した後、アグロバクテリウムを用いてベンサムアナス葉を一過的に形質転換した。形質転換から 3 日後に、eGFP の局在および移動度を調べることでどのエフェクターが PD 制御に関連しているかを調べた。局在解析によって、5 つの PD 局在エフェクターおよび 16 の移動性エフェクターを見出している。次に、この 16 のエフェクターの示す移動性が、単なる拡散であるか、能動的な移動であるのかを調べるために、エフェクターの分子量 (kDa) と移動度 (eGFP が見られる細胞数) を可視化したグラフを作成した。その際、通常の拡散の指標として free eGFP (26 kDa) と 2xeGFP (52 kDa) に加えて、YFP(S)-eGFP (35 kDa) と YFP(L)-eGFP (42 kDa) を発現するコンストラクトを作製し、eGFP の見られた細胞を数えることで分子量と拡散の関係を示す検量線を作製した (図 3)。この検量線およびグラフを用いることによって、検量線より上に位置している 4 つのエフェクター (purple dots) は、能動的に細胞間を移動するエフェクターであることがわかった (hypermobile effector; 図 3)。

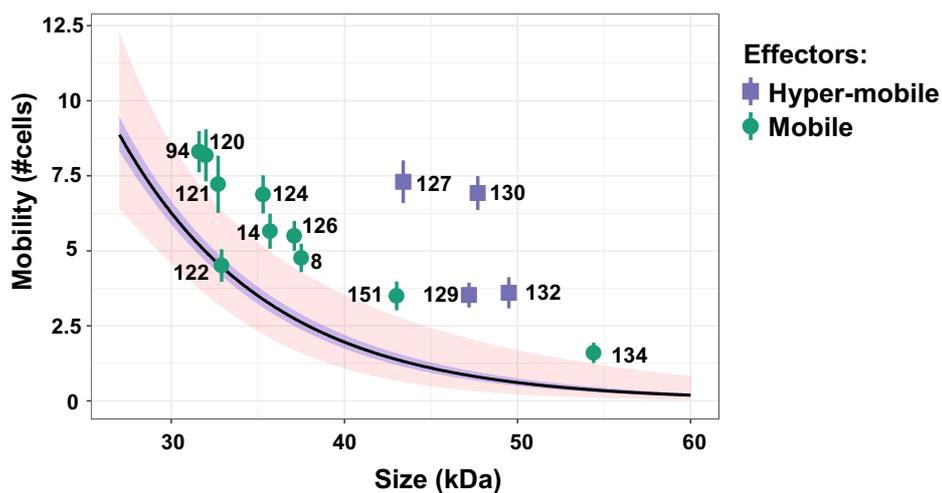


図 3. Mobile effector のスクリーニング

#### 4. Hypermobile effector についての機能解析

3.で見出した Hypermobile effector のうち、ChEC127 および ChEC132 について機能解析を行うため、これらの二つのエフェクターを恒常的に発現するシロイヌナズナの形質転換体を作成した。そして、エフェクターの PD 制御への関与を調べるため、エフェクターを発現する形質転換体に単量体の蛍光タンパク質 mRFP をボンバードメントした。そして、mRFP の細胞間移行の度合いをエフェクターを発現するシロイヌナズナと野生型とで比較を行ったところ、エフェクター発現株において、mRFP の顕著な拡散が認められた (図 4)。以上のことから、本スクリーニングによって得られた Hypermobile effector は、PD 制御に関与する関与することが示唆された。

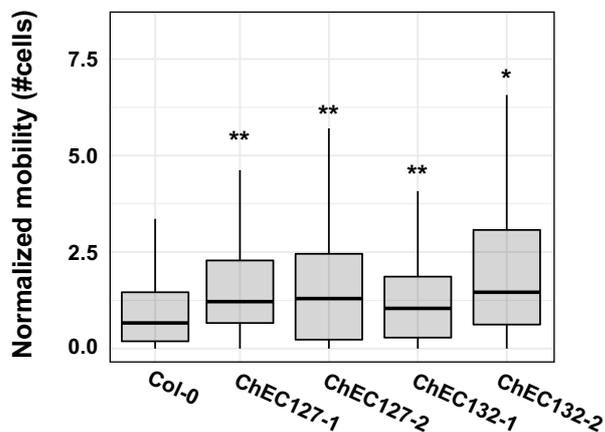


図 4. Hypermobile effector の PD 制御への関与

(参考文献) (1) Faulkner et al. (2013) PNAS, (2) Caillaud et al. (2014) PLoS Pathogen, (3) Sakulkoo et al. (2018) Science and (4) O'Connell et al. (2012) Nature Genet.

#### 成果の発表・関係学会への参加状況

上記研究成果について、すでに 4 つの学会およびシンポジウムで発表済である (詳細は 6.に記載)。

- 第 53 回 感染生理談話会 (ポスター発表・査読なし)
- 2019 IS-MPMI XVIII Congress (口頭発表・査読あり)
- 2019 年 日本植物病理学会 関西支部若手の会 (口頭発表・査読なし ※招待講演)
- 2020 JIC-TSL Autumn Symposium (口頭発表・部局代表として選出)

また、現在上記研究成果についての論文は現在投稿中である (Under review)。