

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成果報告書

平成24年 6月14日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 農学研究科

職名・学年 博士後期課程4年

氏名 吉野香絵

|       |   |            |            |
|-------|---|------------|------------|
| 助成の種類 | 平成23年度 ・ 在外研究長期助成   |            |            |
| 研究課題名 | 植物病原性糸状菌の感染機構に関する分子イメージング解析   |            |            |
| 受入機関  | エクセター大学(英国)   |            |            |
| 渡航期間  | 平成23年 5月20日 ~ 平成24年 5月16日   |            |            |
| 成果の概要 | タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( ) |            |            |
| 会計報告  | 交付を受けた助成金額  | 2,500,000円 |            |
|       | 使用した助成金額  | 2,500,000円 |            |
|       | 返納すべき助成金額   | 0円         |            |
|       | 助成金の使途内訳  | 往復旅費       | 180,000円   |
|       |   | 査証発行料・手数料  | 100,000円   |
|       |   | 滞在費        | 2,220,000円 |
|       |   |            |            |
|       |   |            |            |
|       |   |            |            |

## 成果の概要 / 吉野香絵

研究課題名「植物病原糸状菌の感染機構に関する分子イメージング解析」（受入機関：エクセター大学（英国）、期間：平成23年5月20～平成24年5月16日）における研究成果について下記の通り報告する。

### 研究目的

植物病害による世界の農業生産被害は全収量の10～20%と言われており、そのうち、80%以上が糸状菌（カビ）によって引き起こされている。植物病原性糸状菌の感染戦略を理解し、効果的な防除技術を開発することが重要であることは明らかである。本研究は、この植物病原性糸状菌の感染戦略の詳細を明らかにすることを目的としており、特に感染機構の細胞生物学的な理解を、最新のイメージング技術を用いて推進することに焦点をあてた。

### 研究成果

#### 植物病原糸状菌の感染特異的形態分化に関する研究

イネに甚大な被害をもたらすイネいもち病菌は植物体表面に接着後、発芽および発芽管の伸長を経てその先端に付着器と呼ばれるドーム型の感染特異的な構造物を形成する。その後、付着器内に蓄積した膨圧を利用した物理的な力により侵入菌糸が植物体表面のクチクラ層を突き破って内部へ侵入する。細胞骨格タンパクであるセプチンが付着器機能の成熟期において侵入菌糸形成部位にリング状の構造を形成することがすでに見出されていたが、その構造がどのように植物体内への侵入に寄与しているかは不明であった。セプチン同様アクチン繊維も付着器内においてリング状の構造を形成し、セプチンとの共局在を示す。これらの細胞骨格が、付着器内に蓄積した膨圧の物理的な力への変換および侵入菌糸の生成に寄与していると想定し、共同研究を行った。

#### 1) イネいもち病菌においてセプチンタンパクが細胞骨格として果たす役割

セプチンは細胞分裂や細胞移動に必要な細胞骨格タンパクとして知られており、セプチン遺伝子変異体はイネに対して非病原性を示す。電子顕微鏡観察において侵入菌糸形成は見られていない。膨圧による物理的な力を介した侵入には、その力に耐える為の細胞を支える骨格が必要であると考え、微小管に結合し、先端成長部位に局在することが明らかになっている *TEA1* 遺伝子に GFP を融合させたコンストラクトを作成し、セプチン遺伝子変異体に導入した。結果、野生株ではセプチンと共局在した Tea1-GFP が変異体においては異なった局在（付着器中心部に凝集）を示した。

#### 2) イネいもち病菌におけるセプチンタンパクの Diffusion barrier としての役割

酵母においてセプチンは細胞分裂時に母細胞と娘細胞の境界線にリング状の構造を形成

する。この局在は細胞周期を制御しているだけでなく、母細胞から娘細胞へのタンパクの流動を制御する **Diffusion barrier** としても機能することが明らかになっている。侵入菌糸形成部位のセプチンリング状構造も同様の機能を果たしていると想定し、リング状構造の中心部位（侵入菌糸形成部位）に局在し、アクチンの極性に関与する *LAS17* 遺伝子および *RVS167* 遺伝子の GFP コンストラクトを作成し、セプチン変異体に導入した。両タンパク質共にセプチン変異体において野生株とは異なる局在（細胞質内および細胞膜上に拡散）を示した。又、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 解析により、野生株において処理後に *Rvs167-GFP* の蛍光が回復しないことを確認した。これは酵母における **Diffusion barrier** の研究結果と一致するものであり、蛍光が回復しないのはセプチンが機能している為にタンパクの流動が制限されているためである。*Rvs167-GFP* の挙動を観察したところリング状の構造物内でのみタンパクが流動するという結果も仮説を支持するものであった。

### 3) ウリ類炭疽病菌におけるセプチンタンパクの局在

ウリ類炭疽病菌はウリ科植物を宿主とする病原糸状菌で、イネいもち病菌と同様に付着器内に蓄積した膨圧による物理的な力を用いて侵入する。両病原菌は非常に共通した感染戦略をとるにも関わらず、感染時に果たす様々な遺伝子の機能が異なることが知られている。セプチンを介した細胞骨格の再構築が両菌において共通しているかどうかを観察する為、イネいもち病菌の GFP 融合させたセプチンタンパクをウリ類炭疽病菌に導入し、付着器内における局在を観察した。結果、ウリ類炭疽病菌においても付着器内の侵入菌糸形成が想定される部位にセプチンはリング状の構造を形成した。膨圧を介した侵入様式には共通した細胞骨格の再構築が必要であることが推察された。ウリ類炭疽病菌においてセプチンタンパクが果たす機能については更なる解析が必要である。

### ウリ類炭疽病菌の侵入様式に関する研究

ウリ類炭疽病菌において新規の付着器非依存的な侵入様式が見つかっており、その侵入様式が細胞外 pH 認識関連因子 (*CoPacC*) によって制御されていることをすでに見出している。*CopacC* を介した侵入様式の選択を詳細に調べる為に *CopacC* 遺伝子制御経路の上流に位置し、pH センサーとして機能すると想定される *PalH* および *PalC* に GFP を融合したコンストラクトを作成し、野生株に導入した。細胞外 pH がアルカリにシフトした際に膜に局在するこれらのタンパクが細胞質に移行することを確認し、この結果は他の糸状菌の結果と一致するものであった。これらのタンパクの局在が植物体表面上での侵入様式の選択時にどのように変化するかを帰国後に確認する予定である。又、*copacC* 変異体がイオンの取り込みに関与していることを見出し、細胞外の pH 認識と共に細胞内イオンホメオスタシスの制御がウリ類炭疽病菌の侵入様式の選択を決定していることが想定されたので、引き続き、付着器非依存的な侵入様式の制御に関して研究を行っていく予定である。

## さいごに

1年間の滞英期間中に上記の研究成果をThe British Mycological Society, European conference on fungal geneticsにおいて発表した。又、イネいもち病菌の感染特異的な形態分化に関する共同研究「Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*」（この研究が京都大学教育研究振興財団に支援されていることを論文のAcknowledgementsに記載）は、米Science誌に投稿し、採択された。複数の国際学会への参加および科学雑誌として最高峰に位置するScienceに掲載される研究に携われた経験は今後の研究者人生を考えた際に本当にかげがえのないものになったと感じている。1年間の在外研究を支援して下さった京都大学教育研究振興財団に心より感謝します。