

サンセベリア炭疽病菌感染葉を用いた RNA-seq 解析による病原性関連 候補遺伝子の探索

中村正幸

鹿児島大学農学部食料生命科学科植物病理学研究室

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-2 1-2 4

[TEL:099-285-8683](tel:099-285-8683)

要旨

サンセベリア炭疽病菌 (Cs) は、サンセベリア属の植物のみに感染する極めて宿主特性の高い植物病原糸状菌である。本実験では、Cs の病原性に関わる候補遺伝子を探索するにあたり、Cs のドラフトゲノム解析とアノテーション解析、並びに感染葉における RNA-seq 解析を行った。その結果、Cs のゲノムサイズは、51.2Mb であり、推定遺伝子数は、13,664 個であった。その内、外分泌タンパク質をコードしている遺伝子が、1,334 個あり、植物細胞壁分解酵素であるセルロース分解酵素遺伝子が 45 個、ヘミセルロース分解酵素遺伝子が 43 個、ペクチン分解酵素遺伝子が 56 個認められ、エフェクター遺伝子は 316 個存在した。接種 24 時間後と 48 時間後における Cs の RNA 発現比較では、感染初期の接種 24 時間後に発現が高かった遺伝子が ($\log_2=1$ 以上)、2,259 個認められ、中でもセルロース分解酵素遺伝子とエフェクター遺伝子および機能未知の膜タンパク質遺伝子の中に非常に発現の高い遺伝子が複数確認できた。以上の結果は、これらの遺伝子が感染初期に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

1. 緒言

1996 年、鹿児島県与論町で栽培されていたサンセベリアに炭疽病症状の発生が認められ、枯死する個体が多数出現し (Fig. 1)、大きな被害をもたらした。宿主範囲試験や分子系統解析などから、新種の炭疽病菌であることが判明し、サンセベリア炭疽病菌 (*Colletotrichum sansevieriae*) と命名された¹⁾。本病原菌は、サンセベリア属の植物のみに病原性を示し、非常に高い宿主特異性を有している。現在では、アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリア、アジア各地でその発生が確認されている²⁻⁶⁾。

炭疽病菌は、重要病害を引き起こす病原菌の世界ランクトップ 10 に入り、600 種以上の種が存在し、1000 種を超える植物に感染する。多くの種が、高い宿主特異性を有しており、現在、この特異性を決定している因子の探索が、世界中で精力的に行われている。植物病原糸状菌の病原性関連遺伝子を特定するにあたり、これまでは、遺伝子タギングによる、REMI 法⁷⁾やアグロバクテリウム法⁸⁾による病原性欠失変異株の作出、すなわち、順遺伝学に基づく手法が行われてきた。しかし、これらの手法は、煩雑で時間がかかり、破壊遺伝子の特定が困難な場合がある。そこで近年、次世代シーケンサー

(NGS)の登場により、全ゲノム塩基配列の解読や遺伝子発現解析が、短期間かつ安価で実現したことで、全遺伝子の網羅的な解析が可能となり、逆遺伝学的アプローチが主流になってきた。

本実験では、NGS を用いて、宿主特異性の極めて高いサンセベリア炭疽病菌(以下 Cs)のドラフトゲノム解析ならびに感染葉における発現遺伝子解析(RNA-seq)を行い、病原性に関わる候補遺伝子の探索を目指した。

2. 材料と方法

2.1 供試菌株の培養および接種

供試菌株には、鹿児島県与論町の栽培センセベリアの罹病葉から分離したサンセベリア炭疽病菌 Sa-1-2 株を使用した。-80℃のディープフリーザに保存してある分生子を PDA 培地で培養後、PD 液体培地で菌叢片を培養し、DNA 抽出用の菌糸体を得た。

接種には、PDA 上に形成した分生子を 10^8 個/ml なるように調整し、サンセベリア葉の横切断面に塗布した。

2.2 ドラフトゲノム解析と RNA-seq 解析

DNA の抽出は、Takara NucleoSpin Plant II を用いて行った。抽出 DNA は、Covaris により 400bp になるように断片化した。ゲノムライブラリーは、MGIEasy Universal DNA Library Prep Set と MGISP-100 を用いて構築した。また、アダプターには、MGIEasy DNA Adapters-16 Kit を用いた。環状化 DNA は、MGIEasy Circularization Kit を用いて行い、DNA ボールは、MGISEQ-2000RS High-throughput Sequencing Set により構築した。シーケンシング解析は、DNBSEQ-2000 を用いて、2X150 bp の条件で実施した。

Total RNA の抽出は、Takara NucleoSpin RNA Plant を用いて行い、ライブラリーは、MGIEasy RNA Directional Library Prep Set を用いて構築した。環状化 DNA は、上述の通りに作成し、DNA ボールは、DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit を用いて構築した。シーケンシング解析は、DNBSEQ-G400 を用いて、2X100 bp の条件で実施した。

2.3 アセンブリとアノテーション解析

ゲノムアセンブリは、まず、フォワードとリバースそれぞれのリードを Fastp と Trimmomatic のプログラムを用いて、アダプター除去とトリミングを行った後に、Shovill Faster SPAdes assembly プログラムを用いて、実行した。いずれのプログラムも Galaxy (<https://usegalaxy.org/>)内のウェブツールを利用した。

アノテーション解析は、AUGUSTUS⁹⁾を用い、パラメーターとして *Magnaporthe oryzae* を利用し、コード遺伝子の推定を行った。タンパク質の機能は、FuncitonAnnotator¹⁰⁾もしくは GhostKOALA¹¹⁾を用いて予測した。

エフェクターの予測は、EffectorP-fungi 3.0(<https://effectorp.csiro.au/>)¹²⁾を用いて行った。

2.4 RNA 発現(TPM)解析

アセンブリの際と同じように、フォワードとリバースそれぞれのリードを Fastp と Trimmomatic のプログラムを用いて、アダプター除去とトリミングを行った後に、Kallisto quant を用いて発現量 (TPM) を解析した。

接種 24 時間および 48 時間後における二郡間の発現比較は、TPM データを基に DESeq2 を用いて解析を行った。発現比 2 倍以上ある遺伝子は、volcano plot で表示した。

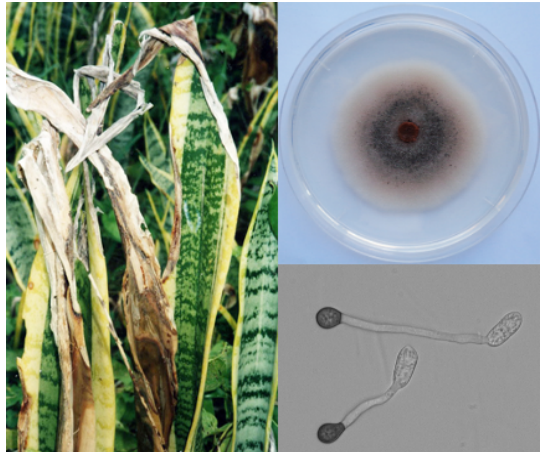


Fig.1 Symptoms of sansevieria anthracnose (left). Colony (upper right) and appressoria (under right) of its pathogen, *C. sansevieriae*.

3. 結果と考察

3.1 アセンブリとアノテーション解析

アセンブリの結果、8,647 個のコンティグを得た。コンティグの平均長は 5,922bp、N50 は 15,122bp であった。Cs のゲノムサイズは 51.2Mb であり、GC 含量は 50.8%であった。また、推定遺伝子数は、13,664 個であった (Table 1)。ウリ類炭疽病菌のゲノムサイズは約 90Mb で、推定遺伝子数は 13,346 個¹³⁾、アブラナ科炭疽病菌のゲノムサイズは 49Mb で、推定遺伝子数は 16,172 個であり¹⁴⁾、Cs も他の炭疽病菌とほぼ同じ遺伝子数であった。

機能アノテーションの付いた遺伝子は 7,162 個 (Fig. 2)、機能未知遺伝子は 5,391 個であり、Cs のみに特異的に存在する遺伝子が 1,111 個認められた。外分泌タンパク質をコードしている遺伝子は、1,334 個推定され、その内、病原性に関わる可能性のある植物細胞壁分解酵素であるセルロース分解酵素遺伝子は 45 個、ヘミセルロース分解酵素遺伝子は 43 個、ペクチン分解酵素遺伝子は 56 個で、計 144 個存在した。また、エフェクタータンパク質遺伝子は 316 個推定され、内 14 個は Cs 特異的であった。他の炭疽病菌でも、エフェクター遺伝子は 300~400 個前後¹⁵⁾、絶対寄生菌であるさび病菌の場合は 800 個以上存在し¹⁶⁾、一方、腐生性の強い灰色かび病菌では 200 個以下であることから¹⁷⁾、寄生性の違いが、エフェクターの数に影響していることが考えられた。

Table 1. Assembly and annotation analysis of *C. sansevieriae* genome

Features	Value	Used program
Genome size	51.2 Mb	Shovill Faster SPAdes
No. of predicted genes	13,664	AUGUSTUS
No. of annotated genes	7,162	FunctionAnnotator
No. of unknown genes	6,502	FunctionAnnotator
No. of candidate effectors	316	EffectorP
No. of PCWDE*	144	FunctionAnnotator

*PCWDE: plant cell wall degrading enzymes

3.2 感染葉における RNA-seq 解析

感染初期に高発現する遺伝子 を特定するために、接種 24 時間後と 48 時間後の各遺伝子の発現比較解析を行った (Fig. 3)。接種 24 時間後で 48 時間後より多く発現していた遺伝子は ($\log_2=1$ 以上)、2,259 個認められた。また、接種 24 時間後にのみ発現していた遺伝子は、235 個認められた (Fig. 4)。

3.3 植物細胞壁分解酵素遺伝子の発現解析

Cs は、感染の際、細胞中層および間隙を這うようにして、菌糸を進展させ (Fig. 5)、水浸状

の病斑を形成する。このことから、病徴進展には、植物細胞壁分解酵素が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、各細胞壁分解酵素遺伝子の発現解析を行った。まず、セルロース分解酵素遺伝子では、特に、エンドグルカナーゼ (g5474) とセロビオシダーゼ (g1718) の発現が、接種 24 後に大きく促進されていた (Fig. 6a)。つまり、エンド型により、セルロースがランダムに切断後、セロビオシダーゼにより、2 糖のセロビオースが遊離され、細胞内に取り入れられた後に、グルコシダーゼにより、単糖のグルコースとなり、炭素源として利用される流れが予想される。次に、ペクチン分解酵素では、ペクチン酸リアーゼ (g8018) とポリガラクトツロナーゼ (g13296、g13462) の発現が高かった (Fig. 6b)。上述したように、Cs は、細胞中層に菌糸を伸ばしながら、病徴を進展させていく。細胞中層は、ペクチンが豊富に含まれていることから、ペクチン分解酵素は、病徴進展に重要な役割を果たしていると考えられる。ヘミセルロース分解酵素遺伝子に関しては、セルロース分解酵素やペクチン分解酵素のように高い発現を示す遺伝子は認められなかった (データは示していない)。

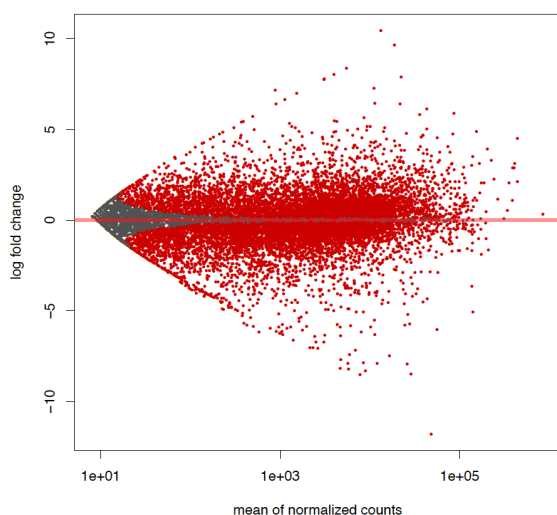


Fig.3 Volcano plot for differential gene expression.

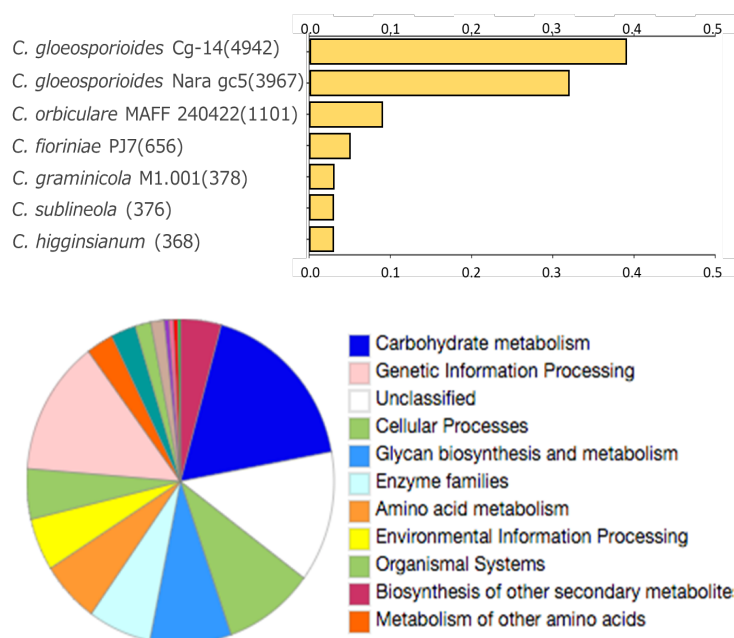


Fig. 2 Distribution in other anthracnose pathogens (upper) and functions (lower) of annotated genes from *C. sansevieriae*.

3.4 エフェクター遺伝子の発現解析

Cs の保持する予測エフェクターは、316 遺伝子存在し、接種 24 時間後に特に高発現していたものは、g10663 であった (Fig. 6c) 。本エフェクターの特徴を EffectorP で解析したところ、アポプラステックに働くエフェクターであることが分かった。つまり、Cs の菌糸が進展する細胞中層と間隙は、まさにアポプラステック領域であり、感染特徴を反映した結果と言える。その他のエフェクターとして、既知エフェクターである、NIS1 (g365) の発現も高かった。

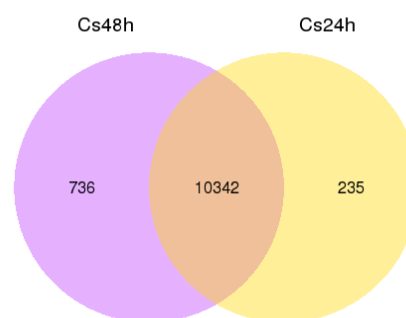


Fig.4 Venn diagram presentation of differential gene expression.

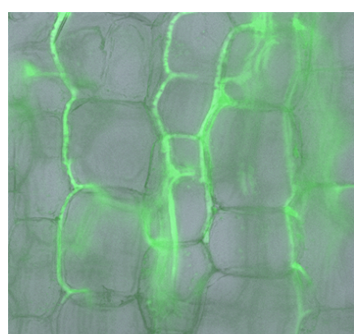


Fig.5 Development of mycelia of GFP labelled *C. sansevieriae*.

3.5 機能未知遺伝子の発現解析

最後に、機能未知遺伝子における発現解析を行った。その結果、g5962 が極めて高い発現を示した (Fig. 6d) 。そこで、InterPro¹⁸⁾ と TMHMM2.0¹⁹⁾ を用いて、本タンパク質の特徴を調べたところ、2 回膜貫通型の膜タンパク質であることが分かった (Fig. 7) 。接種 24 時間後に 48 時間後と比較して、200 倍以上の発現が認められることから、感染初期に何らかの重要な働きをしていると予想される。現段階では、機能は不明であるが、レセプターもしくは細胞膜・壁強化を担っているタンパク質である可能性が考えられる。

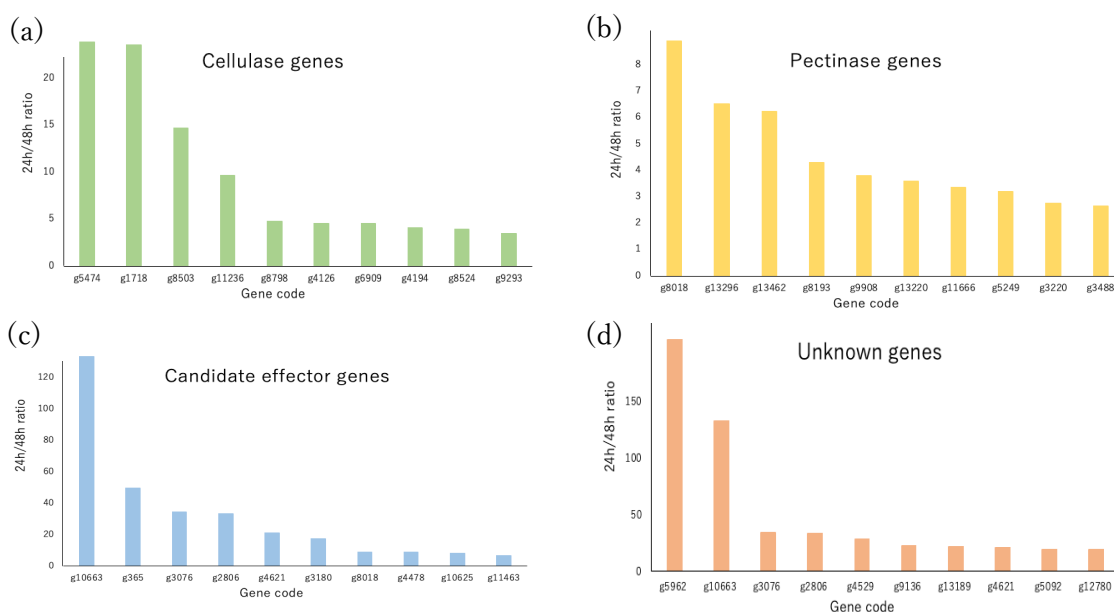


Fig.6 Gene expression ratio between 24 and 48 hours after inoculation of *C. sansevieriae*.

4. 結論

本実験では、Cs の感染初期 (接種 24 時間後) に発現が誘導される遺伝子の解析を行うことで、病原性発揮に重要な候補遺伝子の探索を行った。植物と直接作用すると思われる外分泌タンパク質遺伝子に絞り、解析を行ったところ、植物細胞壁分解酵素であるセルロース分解酵素とペクチン分解酵素で、複数の遺伝子で高い発現を確認した。また、エフェクターでは、アポプラスティックに作用すると予想される遺伝子で、非常に高い発現が確認された。さらに、機能未知遺伝子の中に、全

外分泌タンパク質遺伝子の中で、最も高い発現を示した遺伝子が認められ、本遺伝子は、2 回膜貫通型の膜タンパク質をコードしていることが分かった。

以上、上記の結果は、Cs が感染の際、植物組織の細胞中層と間隙に菌糸を伸ばすことで、病徴を進展させている特徴を反映しており、これら遺伝子が、病原性発揮に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。今後は、これらの遺伝子の破壊株を作出することで、病原性との関わりを解明していく必要がある。

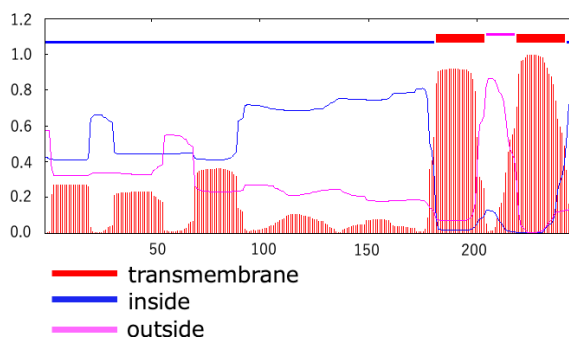


Fig.7 Transmembrane analysis of the highest-expression gene (function unknown), g10663.

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究費助成をしていただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

6. 引用文献

1. Nakamura M, Ozono M, Iwai, H, Arai K. Anthracnose of *Sansevieria trifasciata* caused by *Colletotrichum sansevieriae* sp. nov. (2006) J Gen Plant Pathol 72: 253-256
2. First Report of *Colletotrichum sansevieriae* causing anthracnose of *Sansevieria trifasciata* in Florida. (2012) Plant Dis 96:293
3. Park JH, Han KS, Kim JY, Shin HD. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum sansevieriae* on *Sansevieria* in Korea. (2013) Plant Dis 97:1510
4. Kee YJ, Zakaria L, Mohd MH. Identification, pathogenicity and histopathology of *Colletotrichum sansevieriae* causing anthracnose of *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. J Appl Microbiol (2020) 129:626-636
5. Aldaoud R, DeAlwis S, Salib S. et al. First record of *Colletotrichum sansevieriae* on *Sansevieria* sp. (mother-in-law's tongue) in Australia. (2011) Australasian Plant Dis. Notes 6: 60-61
6. Brand T, Wichura A. First Report on *Colletotrichum sansevieriae* causing anthracnose of *Sansevieria trifasciata* in Germany. (2023) Gesunde Pflanzen 75: 61-66

7. Kahmann R, Basse C. REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. (1999) *Euro J Plant Pathol* 105: 221–229
8. Bundock P, Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJ. (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14:3206–3214
9. Stanke M, Tzvetkova A, Morgenstern B. AUGUSTUS at EGASP: using EST, protein and genomic alignments for improved gene prediction in the human genome. (2006) *Genome Biol* 7 Suppl 1 (Suppl 1): S11.1-8
10. Chen TW, Gan RC, Fang YK. et al. FunctionAnnotator, a versatile and efficient web tool for non-model organism annotation. (2017) *Sci Rep* 7: 10430
11. Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. (2016) *J Mol Biol* 428: 726-731
12. Sperschneider J, Dodds PN. EffectorP 3.0: Prediction of apoplastic and cytoplasmic effectors in fungi and oomycetes. (2022) *Mol Plant Microbe Interact* 35: 146-156
13. Gan P, Ikeda K, Irieda H, Narusaka M, O'Connell RJ, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, Shirasu K. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. (2013) *New Phytol* 197: 1236-1249
14. Zampounis A, Pigné S, Dallery JF, Wittenberg AH, Zhou S, Schwartz DC, Thon MR, O'Connell RJ. Genome sequence and annotation of *Colletotrichum higginsianum*, a causal agent of crucifer anthracnose disease. (2016) *Genome Announc* 18: e00821-16
15. O'Connell, R., Thon, M., Hacquard, S. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. (2012) *Nat Genet* 44: 1060–1065
16. Petre B, Joly DL, Duplessis S. Effector proteins of rust fungi. (2014) *Front Plant Sci* 20: 416
17. Amselem J, Cuomo CA, van Kan JA, et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. (2011) *PLoS Genet* 7: e1002230
18. Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S. et al. (2023) InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 51(D1): D418-D427
19. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. (2001) *J Mol Biol* 305: 567-80

Searching for candidate genes related to pathogenicity of *Colletotrichum sansevieriae*
by RNA-seq analysis

Masayuki Nakamura

Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

Colletotrichum sansevieriae (Cs) is a phytopathogenic fungus with a highly host specificity that infects only plants of the genus *Sansevieria*. In this experiment, we performed draft genome analysis and annotation analysis of Cs, as well as RNA-seq analysis in infected leaves to search for candidate genes involved in the pathogenicity of Cs. The result showed that the genome size of Cs was 51.2 Mb, and the estimated number of genes was 13,664. Among them, 1,334 genes encoding secreted proteins, 45 genes for cellulolytic enzymes, 43 genes for hemicellulolytic enzymes, and 56

genes for pectinases, which are plant cell wall degrading enzymes, were found, and 316 effectors were present. Comparison of RNA expression at 24 and 48 hours post inoculation (HPI) showed that 2,259 genes were highly expressed ($\log_2=1$ or more) at 24 HPI, and that the expression of some cellulolytic enzyme genes, effector genes and genes encoding membrane proteins of unknown function were particularly high. These results suggest that these genes may play an important role in the early stages of infection.