

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17380028  
 研究課題名（和文） 灰色かび病菌における多犯性発現の分子機構の解明  
 研究課題名（英文） An analysis about the molecular mechanism of the pathogenicity expression of *Botrytis cinerea*  
 研究代表者  
 阿久津 克己（AKUTSU KATSUMI）  
 茨城大学・農学部・教授  
 研究者番号：10151002

## 研究成果の概要：

本研究において、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の新たなG $\alpha$ タンパク質遺伝子として*bcg3*を、G $\beta$ タンパク質遺伝子として*bcbg1*を単離解析した結果、Bcg3はクラスIIIに属し、Bcbg1は*F. oxysporum*のFgb1や*M. grisea*のMgb1と高い相同性を示した。また、それらの遺伝子破壊による機能解析から、*bcg3*遺伝子はcAMP情報伝達系に制御された病原性発現に関与することが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,800,000	0	6,800,000
2006年度	3,600,000	0	3,600,000
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	15,700,000	1,590,000	17,290,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：*Botrytis cinerea*, 多犯性発現機構, 病原性関連遺伝子, シグナル伝達係,

Gタンパク質, cAMP, 遺伝子破壊

## 1. 研究開始当初の背景

*Botrytis cinerea* Persoon: Friesは、少なくとも235種の植物の果実、花、緑色組織に“灰色かび病”を引き起こす多犯性的病原菌であり、農業生産において重要な作物を含む多種多様な植物病害の原因になる。本菌の病原性に関する遺伝子レベルの研究は、抵抗性育種、化学的あるいは生物学的防除に結びつく基盤的研究として位置づけられ、これまで

に毒素、加水分解酵素、植物防御機構の打破等に関与する多数の病原性関連遺伝子が同定されている。しかしながら、本菌における病原性関連遺伝子の発現機構については研究報告が著しく少なく未解析の状況にある。これらの病原性関連遺伝子の発現制御機構を解析することは、本菌の多犯的病原性機構の解明に向けての次なるステップとの現状認識から、

本研究がスタートした。

## 2. 研究の目的

灰色かび病菌 (*B. cinerea*) は、多犯性で知られ、農業生産上重要な病原菌である。本菌の防除には、殺菌剤の使用が余儀なくされており、本菌の対抗手段に関する知見はまだ乏しい状況である。そこで、*B. cinerea*に対する新たな防除手段を構築するために、侵入・感染のメカニズムを分子生物学的に解析することが必要であると考え、多くの植物病原糸状菌において病原性制御への関与が知られている三量体Gタンパク質を介した病原性発現機構の解明を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試菌株とプラスミド

*B. cinerea*供試菌株は、単分生子分離を行なったホモカリオン株を用いた。ゲノムDNA抽出は、PS 培地で分生子を20° C、16時間振とう培養した菌糸体を用いた。プロトプラスト調製には、1/2 PDB 培地で分生子を20° Cで36-48時間培養した菌糸体を用いた。形質転換株はハイグロマイシンBあるいはジェネティシンを含むPDA培地において培養・継代維持した。菌株の形質転換ならびに遺伝子置換ベクター構築は、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子とネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子の各カセットを含むpII99を用いた。プラスミドの増幅には*E. coli*のDH5 $\alpha$ あるいはJM109菌株を用いた。

### (2) サザンブロットとシーケンス解析

サザンブロット解析は菌糸体ゲノムDNAを制限酵素で消化し、電気泳動で分画後、メンブレンに転写・固定した。シーケンシング反応はDNAシーケンスキットを用いて行なった。

### (3) *bcg3* と *bcgbl* 遺伝子のクローニング

#### a) *bcg3* 遺伝子のクローニング

G $\alpha$  タンパク質GTP結合モチーフのG-1ボッ

クスでフォワード側、G-5ボックスでリバース側の縮重プライマーを設計した。GqAG1F1およびGqAG5R1は、糸状菌6種のクラスIII G $\alpha$  タンパク質のアミノ酸共通配列を基に設計し、3'側の配列がクラスIII特有の部位となるnestedプライマーを設計した。菌株のゲノムDNAをテンプレートとして調製した反応液を35サイクル反応、最終伸長反応、冷却プログラムでPCR反応を行なった。PCR反応液の一部をテンプレートとし、nestedプライマーを用いてPCR反応を行なった。Nested PCRで得られた*bcg3*部分断片をプローブとしたサザンブロット解析により、相同領域を含む*EcoRV*断片を環状化し、インバースPCRを行なった。サザンブロット解析により、相同領域が確認された*NsiI*断片を環状化し、再度インバースPCRを行なった。前述した断片の配列と連結して*bcg3*遺伝子を中央に含む*NsiI-EcoRV*断片の全塩基配列を決定した。*bcg3*遺伝子の推定ORFを増幅するプライマーを用いて菌株cDNAをテンプレートにPCR反応を行い、増幅断片をクローニング、シーケンス解析し、イントロン部位を決定した。

#### b) *bcgbl* 遺伝子のクローニング

糸状菌6種のG $\beta$  タンパク質のアミノ酸配列の内、保存性の高い領域で縮重プライマーを設計した。a)と同様の方法で、*bcgbl*遺伝子を中央に含む*EcoRV-HindIII*断片の全塩基配列とイントロン部位を決定した。

### (4) RNA抽出およびRT-PCR

分生子懸濁液をタバコ葉片に接種し、22° Cで培養した後、経時的にサンプルを回収した。接種葉片からmRNAを精製した後、cDNAを合成した。1/2 PDB培地あるいはグルコース最少培地で分生子を20° Cで24時間振とう培養した菌体からmRNAを精製し、cDNAを合成した。*bcg3*あるいは*bcgbl*遺伝子の推定cDNA配列を基に、RT-PCRに用いるプライマーを合成した。これらの遺伝子の宿主感染時における発現を

解析するために、cDNAをテンプレートとして各遺伝子に特異的なプライマーを用いて反応液を調製した。この反応液を(3)aと同様のプログラムでPCR反応を行なった。各cDNAを反応液中で**bcg3**あるいは**bcgb1**遺伝子に特異的なプライマーにより、低サイクル数でPCR増幅し、メンブレンにブロットした後、ハイブリダイゼーションにより、これら遺伝子の転写を検出した。

#### (5) **bcg3**と**bcgb1**遺伝子破壊ベクターの構築

##### a) **bcg3**遺伝子破壊ベクターの構築

*NsiI-EcoRV bcg3*遺伝子座の非コード領域における*XhoI*サイトを避けて設計されたプライマーを用いてゲノムDNAをテンプレートとしたPCRを行ない、得られた断片をクローニングした。このクローンを*HindIII*と*XhoI*で二重消化し、**bcg3**遺伝子のN末端の一部を含む領域を削除した。そして、pCSN43からの*HindIII-XhoI hph*遺伝子発現カセットと置換してpΔ**bcg3**を構築した。形質転換のために、これらプラスミドを大量調製した。

##### b) **bcgb1**遺伝子破壊ベクターの構築

**bcgb1**遺伝子相同領域を含む*EcoRV*断片を環状化したものをテンプレートに用いてインバースPCRを行ない、得られた断片をクローン化し、*SacI*と*HindIII*で二重消化した。この*SacI-HindIII*断片をpCSN43における*SacI-HindIII*サイトに連結した。次に**bcgb1**遺伝子相同配列の下流領域をクローニングするために、TR349-1系統のゲノムDNAをテンプレートに用いて*XhoI*と*KpnI*認識配列をそれぞれ付加したプライマーによるPCRを行なった。得られた断片を*XhoI*と*KpnI*で二重消化した。この*XhoI-KpnI*断片を**bcgb1**遺伝子の上流領域を含むpCSN43の*XhoI-KpnI*サイトに連結し、pΔ**bcgb1**を構築した。形質転換のために、これらプラスミドを大量調製した。

#### (6) プロトプラスト調製と形質転換

プロトプラスト調製ならびに形質転換の方法は、van Kanら(1997)の方法を一部改編して行った。

#### (7) 分生子および菌核形成試験

分生子形成は、菌糸体をPSA培地で暗黒化、20°Cで3日間培養、BLB照射下、3日培養、暗黒下で4日間培養した後、1プレート当たりの分生子数を測定した。cAMPの影響は10 mM cAMP-Na含有PSA培地で調べた。菌核形成は、菌糸体をPDA培地で暗黒下、20°Cで20日間培養した後、1プレート当たりの菌核数を測定した。cAMPの影響はcAMP-Naを2-10mM含有PDA培地で調べた。

#### (8) 分生子の発芽率と付着器形成率の評価

分生子懸濁液をスライドグラス上に滴下後暗黒下、22°Cで培養し、以後経時的にサンプルを回収し、カルノア液で固定後、顕微鏡で分生子発芽率および付着器形成率を測定した。侵入率は、分生子懸濁液をタマネギ鱗片表皮上に接種後、経時的にサンプルを回収し、FAAによる固定した後、侵入率を測定した。

#### (9) 病原性検定

分生子懸濁液をタバコ切葉上に接種し、密閉したプラスチック・ボックス内で湿潤状態を維持し、固定後に経時的に観察した。

#### (10) ストレス耐性試験

酸化ストレス耐性能は、スクロース最少寒天培地に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加した培地に菌糸体を移植した後、暗黒下、22°Cで培養し、菌叢の半径を計測した。高浸透圧耐性能は、PDAにNaClを添加した培地に菌糸体を移植した後、暗黒下、22°Cで培養し、菌叢の半径を計測した。

#### (11) 酵母Two-hybridシステム

MACHMAKER GAL4 Two-hybrid System 3を用いて、タンパク質間の相互作用の確認を行なった。Baitは、**bcg3**遺伝子のORFを*BamHI*と*PstI*の認識配列をそれぞれ付加したg3BamHI-Fおよびg3PstI-Rプライマーを用いてPCRにより

増幅し、その産物を *Bam*HI および *Pst*I で二重消化して、pGBKT7ベクターの *Eco*RI および *Bam*HI 部位に連結することで作製した。Preyは、*bcbgI* 遺伝子のORFを *Eco*RI と *Bam*HI の認識配列をそれぞれ付加した *gb1Eco*RI-F および *gb1Bam*HI-Rプライマーを用いてPCRにより増幅し、その産物を *Eco*RI と *Bam*HI で二重消化して、pGADT7ベクターの部位に連結することで作製した。BaitおよびPreyは、YEAST maker™ Yeast Transformation System 2 で出芽酵母 AH109に共形質転換され、SD/-Trp/-Leu 培地によってLeu+Trp+ 形質転換体を確認し、SD/-Trp/ -Leu/-Ade/-His/X- $\alpha$  -Gal培地で相互作用を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規G $\alpha$ サブユニット遺伝子 (*bcg3*) と G $\beta$ サブユニット遺伝子 (*bcbgI*) の単離

*bcg3* 遺伝子を中央に含む約5.2-kb *Nsi*I -*Eco*RV 域の全塩基配列を決定した (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AB188196)。全長cDNAの解析から、本遺伝子は1065 bp (イントロン込みで1342 bp) からなり、5つのイントロンで分断されており、推定されるアミノ酸配列は355残基であることが明らかとなった。また、*bcg3* 遺伝子がゲノム上に単一コピーで存在することが確認された。*bcg3* 遺伝子の推定アミノ酸配列を他の主な植物病原糸状菌のG $\alpha$ サブユニットと比較したところ、クリ胴枯病菌 (*C. parasitica*) のCpg2と79.4%、*M. grisea*のMagAと78.6%、トウモロコシ黒穂病菌 (*U. maydis*) のGpa3と69.9%の相同性を示し、近縁種である菌核病菌 (*S. sclerotiorum*) のSgp1とは96.9%と高い相同性が認められた。一方、*B. cinerea*で既報のBcg1およびBcg2とは、それぞれ48.7%、42.9%と比較的低い相同性であった。Bcg3は、多くのG $\alpha$ タンパク質に見られる5つのGTP結合モチーフを有しており、N末端にはミリストイル化部位が存在していた。

一方、C末端には、コレラや百日咳毒素によって触媒されるADPリボシル化部位は存在していなかった。このことは、Bcg3が哺乳類におけるG $\alpha$ iファミリーではなく、G $\alpha$ sファミリーと同様にアデニル酸シクラーゼに促進的に作用するG $\alpha$ sサブユニットとして機能していることが示唆された。

*bcbgI* 遺伝子は1074 bp (イントロン込みで1357 bp) からなり、4つのイントロンで分断されており、推定されるアミノ酸配列は358残基であることが明らかとなった。また、*bcbgI* 遺伝子がゲノム上に単一コピーで存在することが確認された。*bcbgI* 遺伝子の推定アミノ酸配列を他の主な植物病原菌のG $\beta$ サブユニットと比較した。キュウリつる割病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) のFgb1と89.9%、*C. parasitica*のCpgb1 および *M. grisea*のMgb1と89.3%という高い相同性が認められた。また、*U. maydis*のBpp1とは69.3%の相同性を示した。Bcbg1は他のG $\beta$ サブユニットと同様に、N末端から57アミノ酸残基を除く全長に、WD(Trp-Asp) リピートが7つ並んでいた。

##### (2) 感染時における*bcg3*および*bcbgI*遺伝子の発現解析

タバコ葉片への感染時における*bcg3*および*bcbgI*遺伝子の発現様式を調査した。表皮への侵入は接種12時間後あたりから見られた。RT-PCRにより*bcg3*および*bcbgI*遺伝子は、接種直後の0時間から病斑伸展が見られる48時間までの全生育段階において発現が確認された。これら遺伝子の感染時における発現様式を定量的に調査した。その結果、*bcg3*遺伝子は感染時の全生育段階で*bcg1*や*bcg2*遺伝子に比べ、極めて低いレベルの発現を示した。それに対し、*cgbI*遺伝子は、感染時の全生育段階で*bcbgI*遺伝子と同等の高いレベルで発現していた。*in vitro*培養菌体のmRNAサンプルから合成し

たcDNAをテンプレートとした半定量RT-PCRにおいても類似した結果が得られた。これら4種の生育段階において、G $\alpha$ およびG $\beta$ サブユニット遺伝子の発現量に差は見られなかった。

### (3) *bcg3* 遺伝子の機能解析

プロトプラスト-PEG法により形質転換を行った結果、二重交叉の相同組換えにより*bcg3*遺伝子破壊ベクターが導入された核を含む形質転換株が3個体得られた。これら形質転換株は、*bcg3*遺伝子が欠失した核と正常な核が混在しているヘテロカリオンであったので、単孢子分離によってホモカリオン化することを試みた。結果、7個体の*bcg3*遺伝子が欠失した核のみをもつホモカリオン株が得られた。

*bcg3*遺伝子破壊株は野生型株に比べて分生子形成能が約70%減少した。この変異は培地にcAMPを添加することで回復した。また、*bcg3*遺伝子破壊株は、著しい菌核形成の増加を示した(1プレート当たり約100個)。この変異はcAMPを加えることにより、濃度依存的に菌核形成を減少させた。以上の結果、Bcg3は分生子形成を正に、菌核形成を負に制御することが明らかとなった。

*bcg3*遺伝子破壊株は、分生子の発芽率が培養初期に低下するが、その後野生株と同等となる遅延現象を示した。これらの発芽遅延は、cAMPの添加により回復が認められた。Bcg3は分生子発芽に明確な機能を持たないことが示唆された。

1/2 PDB培地を含む接種液では*bcg3*遺伝子破壊株と野生株の付着器の形態・形成率に差が見られなかった。グルコース最少培地を含む接種液の場合、*bcg3*遺伝子破壊株の付着器形成率は野生株に比べて減少した。培地にcAMPを添加することにより、野生株と同様の形態ならびに付着器形成率を示した。

1/2 PDB培地を含む接種液では*bcg3*遺伝子破壊株と野生株のタマネギ表皮への侵入能力に

差が見られなかった。グルコース最少培地を含む接種液の場合、発芽分生子当たりの侵入率は減少した。培地にcAMPを添加することで、野生株同様の付着器形成能を示し、侵入率の回復が認められた。以上のことから、Bcg3は、主な栄養源が糖に限定された条件下において、付着器形成ならびに侵入能力を正に制御することが明らかとなった。

1/2 PDB培地を含む接種液では*bcg3*遺伝子破壊株と野生株のタバコ切葉における病斑形成に差が見られなかった。グルコース最少培地を含む接種液の場合、*bcg3*遺伝子破壊株は野生株と同様の水浸状病斑を形成するが、その伸展は制限された。cAMPの添加により野生株と同程度に病斑伸展の回復が認められた。以上のことから、Bcg3は接種時の栄養源が限定された条件下で病斑伸展に関与することが明らかとなった。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む培地において、野生株は25mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下で生育できたが、*bcg3*遺伝子破壊株は生育できなかった。また、NaClを含む培地において*bcg3*遺伝子破壊株は野生株に比べて生育の遅延を示した。以上の結果、*bcg3*遺伝子破壊株は酸化および高浸透圧ストレスへの感受性が高まっていることが明らかとなった。

### (4) *bcgb1* 遺伝子の機能解析

プロトプラスト-PEG法により形質転換を行った結果、二重交叉の相同組換えにより*bcgb1*遺伝子破壊ベクターが導入された核を含む形質転換株が1個体得られた。この形質転換株は、*bcgb1*遺伝子が欠失した核と正常な核が混在しているヘテロカリオンであったため、単孢子分離によるホモカリオン化を試みたが、ホモカリオン株は得られなかった。

### (5) Two-hybridシステムによるBcg1とBcgb1の相互作用

Bcg3 (G $\alpha$ ) とBcgb1 (G $\beta$ ) タンパク質間の相互作用をTwo-hybrid法により試験した。そ

の結果, SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- $\alpha$ -Gal培地で, Bcg3とBcg1では相互作用が確認されなかった. また, SD/-Trp/-Leu//X- $\alpha$ -Gal培地, SD/-Trp/-Leu/-Ade培地SD/-Trp/-Leu/-His培地で, MEL1, ADE2, HIS3それぞれの活性をみたが, いずれのレポーター遺伝子も活性を示さず, 相互作用は確認されなかった.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Y. Fukumori, S. Osada, M. Nakajima, K. Akutsu, Ultrastructural studies of soerematia in gray mould (*Botryotinia fuckeliana*), J Gen Plant Pathol 75(3): 188-190, 2009(査読有)
2. N. Someya, K. Tsuchiya, M. T. Noguchi, K. Akutsu and H. Sawada, Fungal cell wall degrading enzyme-producing bacterium enhances the biocontrol efficacy of antibiotic-producing bacterium against cabbage yellows Journal of Plant Diseases and Protection 114:108-112, 2007(査読有)
3. M. Yasuda, M. Kusajima, M. Nakajima, K. Akutsu and H. Nakashita, Thiadiazole carboxylic acid moiety of tiadinil, SV-03, induces systemic acquired resistance in tobacco without salicylic acid accumulation Journal of Pesticide Science 31(3): 329-334, 2006(査読有)
4. K. Akutsu, Studies into biocontrol technology and development of genetic control technology for plant diseases J Gen Plant Pathol 72:396-399, 2006(査読有)
5. K. Takase, K. Hagiwara, H. Onodera, Y. Nishizawa, M. Ugaki, T. Omura, S. Numata, K. Akutsu, H. Kumura and K. Shimazaki, Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance Biochem. Cell Biol. 83:239-249, 2005(査読有)
6. S. Osada, T. Hosaka, M. Nakajima and K. Akutsu, Molecular cloning of a novel G $\alpha$  subunit gene and a G $\beta$  subunit gene from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*, J Gen Plant Pathol 71(6): 408-413, 2005(査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. 新田良太, 間庭愛, 中島雅己, 阿久津克己,

病原性の異なる*Botrytis cinerea*株のトマト葉における感染について 平成 20 年度日本植物病理学会大会, 2008 年 4 月 27 日

2. 内堀美和, 山崎亮一, 長田茂穂, 中島雅己, 阿久津克己, *Botrytis cinerea*のGタンパク質 (BCG3) と相互作用するタンパク質の探索, 平成 20 年度日本植物病理学会大会, 2008 年 4 月 26 日

3. 馬場達也, 高橋真理子, 中島雅己, 阿久津克己, *Botrytis tulipae*におけるGタンパク質 (BTG3) の機能解析, 平成 20 年度日本植物病理学会大会, 2008 年 4 月 26 日

4. 新田良太, 間庭愛, 中島雅己, 阿久津克己,

病原性が異なる *Botrytis cinerea* 株のトマト葉における感染について、日本植物病理学会関東部会, 2007 年 9 月 13 日

5. 長田茂穂, 中島雅己, 阿久津克己, 灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)の三量体Gタンパク質  $\alpha$  サブユニット(Bcg3)はグルコース感知を通じて病原性発現に関与する, 平成 19 年度日本植物病理学会大会, 2007 年 3 月 30 日

6. 間庭愛, 福森庸平, 中島雅己, 阿久津克己,

子のう胞子由来の *Botrytis cinerea* 弱病原性株の感染行動について、平成 18 年度日本植物病理学会大会, 2006 年 6 月 4 日

7. 長田茂穂, 梅原済, 山崎亮一, 中島雅己, 阿久津克己, 灰色かび病菌(*Botrytis cinerea*)の日本分離株における三量体Gタンパク質  $\alpha$  サブユニット遺伝子(*bcg3*)の機能解析、平成 18 年度日本植物病理学会大会, 2006 年 6 月 4 日

8. 福森庸平, 中島雅己, 阿久津克己, 病原性の異なる子のう胞子由来株を用いた灰色かび病菌の病原性関連因子の解析, 平成 18 年度日本植物病理学会大会, 2006 年 6 月 4 日

9. 平川崇史, 中島雅己, 阿久津克己, アグロバクテリウム法による *Botrytis* 属菌の形質転換係の確立, 平成 17 年度日本植物病理学会大会, 2005 年 3 月 31 日

10. 福森庸平, 中島雅己, 阿久津克己, 同一子のう由来の子のう胞子を用いた灰色かび病菌の病原性の解析, 平成 17 年度日本植物病理学会大会, 2005 年 3 月 31 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿久津 克己 (Katsumi AKUTSU)  
茨城大学・農学部・教授  
研究者番号: 10151002

### (2) 研究分担者

中島 雅己 (Masami NAKAJIMA)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号: 70301075