

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H03943

研究課題名(和文)疫病菌交配ホルモンが制御する性分化の分子機構の全容解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation and application of molecular mechanism of Phytophthora sexual reproduction controlled by mating hormones

研究代表者

小鹿 一 (OJIKA, Makoto)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50152492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,800,000円

研究成果の概要(和文)：作物病害菌である疫病菌の有性生殖を制御する交配ホルモン(1と2)の生合成酵素・受容体の解明を目指した。生合成酵素については、RNA-SeqによりA1,A2交配型間の遺伝子発現差を示すシトクロームP450(CYP)遺伝子に絞り、得られた候補遺伝子を異種発現した結果、2(=11,16-dihydroxyphytol)の生合成遺伝子の1つ11-hydroxylaseの同定に成功した。一方、受容体は、構造類似性や核内受容体等で絞り込み、1つの受容体候補ペア(94%相同性)を見出したので今後、遺伝子ノックアウト等の立証実験が望まれる。さらに急速な蔓延の原因とされる無性生殖の制御因子の探求も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農作物に甚大な被害を与える病原糸状菌「疫病菌」は変異が早く、薬剤耐性化が問題となっている。その主要因とされる有性生殖の分子機構の解明は、疫病菌の制御に向けた重要課題である。疫病菌の有性生殖は超微量で働く二種の交配ホルモンにより制御されているため、その生合成酵素・受容体を同定することは、疫病菌有性生殖の分子基盤を確立し、それに立脚した疫病菌制御の方法の開発につながる。一方、疫病菌の無性生殖は農作物に短期的な大被害を与える要因である。野菜ジュースから単離したlycoside類とフラボノイドは低濃度で無性生殖(遊走子嚢形成)を阻害するため、将来の環境低負荷型防除剤の開発に有用な示唆を提供する。

研究成果の概要(英文)：The project aimed to elucidate the biosynthetic enzymes and receptors of the mating hormones (1 and 2) that control the sexual reproduction of Phytophthora, a crop disease fungus. Regarding biosynthetic enzymes, RNA-Seq was used to narrow down the cytochrome P450 (CYP) genes, which show differences in gene expression level between the A1 and A2 mating types. We succeeded in identifying 11-hydroxylase as one of the biosynthetic genes for 2 (=11, 16-dihydroxyphytol). On the other hand, the receptors were narrowed down by structural similarity and nuclear receptors, etc., and one receptor candidate pair (94% homology) was found. The regulators of asexual reproduction that are responsible for the rapid epidemic was also investigated.

研究分野：天然物化学

キーワード：疫病菌 交配ホルモン 有性生殖 Phytophthora

1. 研究開始当初の背景

(1) 疫病菌とその繁殖戦略

疫病菌は *Phytophthora* 属の糸状菌で、世界3大植物病原菌の1つに数えられる。特に、ジャガイモ疫病菌 *P. infestans* により1840年代に発生した「アイルランド飢饉」では約100万人の餓死者が出し、現在でもジャガイモ疫病による損害は世界で年間数十億ドルにのぼる。疫病菌は、異なる交配型(A1型とA2型)が出会うと有性生殖を行い耐久性の有性孢子「卵孢子」を形成する(図1)。その際、交配ホルモン(A1型の分泌する1、A2型の分泌する2)を別の交配型が感知する。疫病菌にとって有性生殖は、交配による急速な悪性化や耐久性有性孢子による地球規模の拡散の戦略であり、その分子機構解明は長期的な疫病菌制御にとって重要な鍵となる。

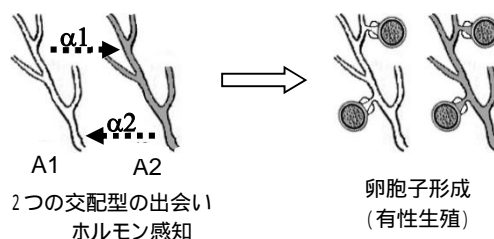


図1. 疫病菌交配ホルモン 1, 2の働き

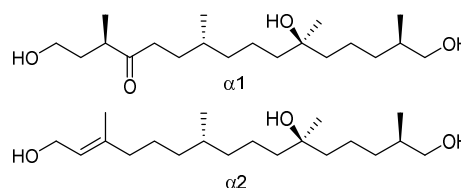
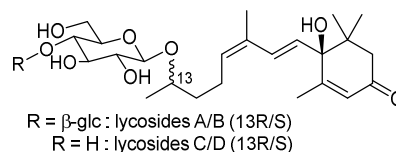


図2. 交配ホルモンの化学構造

一方、疫病菌の無性生殖は無性孢子から無数の遊走子を放出することによる短期間の急速な被害拡大に関連している。従って無性孢子的形成を制御する物質(特に天然化合物)を発見できれば、環境低負荷型の薬剤開発につながると期待される。このような発想で開発された疫病菌防除剤は知られていなかった。

(2) 従来成果

研究代表者らは2005年、長年の懸案であった疫病菌交配ホルモンの1つ1の同定に初めて成功した(図2)¹。2011年にはA2交配型から2の同定にも成功し、同時に2がphytolからA2交配型により生合成され、1がA1交配型により2から生合成されるという生合成ルートを解明した²。さらに、両ホルモンの構造活性相関を解析した³。約70株の疫病菌を使ってホルモンに対する応答・ホルモンの生産性を調べることによる種を超えた普遍性の検証を達成した⁴。以上の成果により、疫病菌の交配ホルモンを化学的側面からほぼ解明したといえる。しかし、「疫病菌有性生殖の分子基盤の全容解明」を目指す本研究課題を完了するには、ホルモンの生合成機構や受容体の同定などケミカルバイオロジー的側面の課題解決が求められた。そこで、2010年代からこれらタンパク質の精製を試みてきた⁵。受容体探索では、交配ホルモンの蛍光プローブ、光親和性プローブを合成し交配型選択的染色・結合を目指したが成功しなかった。また生合成酵素の同定では、菌体抽出物では酵素活性が即座に失われた。これらの結果は、受容体および生合成酵素の同定は生化学的手法では困難であることを示唆していた。



一方、無性生殖阻害物質として野菜ジュースからlycoside類⁶およびフラボノイド⁷を単離した(図3)。Lycoside類はナス科野菜疫病菌 *P. capsici* の無性孢子的形成を2.1-7.6 μMで半分に抑制した。またフラボノイドは構造の違いが阻害活性に大きく影響し、最も高い阻害活性はgenistein (IC₅₀ = 4.6 μM)で観測された。これらは食品由来の成分なので将来、安全な疫病菌防除剤としての応用が期待された。

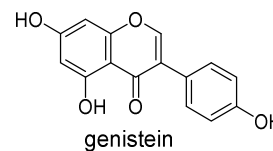


図3. 無性生殖阻害物質

[参考文献]

1. Qi, J.; Asano, T.; Jinno, M.; Matsui, K.; Atsumi, K.; Sakagami, Y.; Ojika, M. Characterization of a *Phytophthora* Mating Hormone, *Science*, 309, 1828 (2005).
2. Ojika, M.; Molli, S. D.; Kanazawa, H.; Yajima, A.; Toda, K.; Nukada, T.; Mao, H.; Murata, R.; Asano, T.; Qi, J.; Sakagami, S. The second *Phytophthora* mating hormone defines interspecies biosynthetic crosstalk, *Nat. Chem. Biol.* 7, 591-593 (2011).
3. Molli, S. D.; Qi, J.; Yajima, A.; Shikai, K.; Imaoka, T.; Nukada, T.; Yabuta, G.; Ojika, M. Structure-activity relationship of α hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*, *Bioorg. Med. Chem.* 20, 681-686 (2012).
4. Tomura, T.; Molli, S. D.; Murata, R.; Ojika, M. Universality of the *Phytophthora* mating

hormones and diversity of their production profile, *Sci. Rep.* 7, 5007/1-12 (2017).

5. 小鹿一、科研費基盤研究(A)「疫病菌交配ホルモンの受容体探索とシグナル伝達の解析 (No. 26252015)」(2014-2017年度)。
6. Iwai, R. Han, C.; Govindam, S. V. S.; Ojika, M. Lycosides, unusual carotenoid-derived terpenoid glycosides from a vegetable juice, inhibit asexual reproduction of the plant pathogen *Phytophthora*, *J. Agric. Food Chem.* 66, 163-169 (2018).
7. 小鹿一、科研費新学術領域(公募)「植物病原糸状菌の生殖を制御する宿主植物の化学成分と制御機構・応用 (18H04612)」(2018-2019年度)

2. 研究の目的

本研究課題では疫病菌の有性生殖を制御する交配ホルモンの生合成酵素および受容体の同定を目指した。なお、上記の従来の成果から生化学的アプローチが困難であることが判明したので、本課題からは遺伝子発現解析に基づくアプローチを採用した。交配ホルモンは「フィトール 2-1」のルートで生合成され、前半の変換は A2 交配型により、後半は A1 交配型により進行するので、それぞれの交配型で 2 合成酵素、1 合成酵素が優先的に発現していると仮定して、これら酵素の同定を行う。2 は phytol が 2 か所水酸化されたもの (11,16-hydroxyphytol) であり、1 はさらに酸化が進んだ化合物であるので、シトクローム P450 (CYP) など酸化修飾酵素に的を絞って探索する。一方、受容体は、両交配型ともにゲノムに各遺伝子をもつが発現レベルにより交配型が決定されること、さらにホルモンの構造類似性から受容体構造の類似性、脂溶性から核内受容体の可能性を条件に探索することとした。

一方で、野菜ジュースやトマトから発見していた無性生殖阻害物質 lycoside 類、フラボノイドについても、その阻害機構を解明するため遺伝子発現解析を行った。

3. 研究の方法

疫病菌の A1 交配型では 1 生合成酵素と 2 受容体が、A2 交配型では 2 生合成酵素と 1 受容体が優先的に発現していると期待される。そこで、各交配型の複数の菌株を用意し、それぞれから total RNA を抽出、cDNA に変換して、次世代シーケンサーで RNA-Seq 解析 (外注) を複数回行った。第 1 回では *P. nicotianae* (A1: 3 株, A2: 4 株) と *P. capsici* (A1: 2 株, A2: 4 株) を用い、異なる培地 (V8-agar, Czapek-Dox) や培養時間も設定して行った。第 2 回では *P. nicotianae* (A1: 3 株, A2: 3 株, V-8) を用いて確認を行った。生合成遺伝子の絞込みは以下のように行った。(1) A2 交配型/A1 交配型の発現比が >1.41 倍 (Log ratio>0.5、2 の場合) (2) 発現レベルが有意 (最大発現遺伝子の約 1%程度以上) (3) CYP および他の酸化酵素。これにより数遺伝子に絞り、各遺伝子を異種発現して、形質転換体に phytol や 2 を投与してホルモンへの変換能を調べた。異種発現の宿主としては研究分担者が確立していたエンドファイトの一種 *Epichloë festucae* を用いた。受容体遺伝子は、*P. nicotianae* の上記 RNA-Seq データに加えゲノム解析も行い、(1) 発現レベルによる交配型決定、(2) ホルモンの構造類似性から受容体構造の類似性、(3) ホルモンの脂溶性から核内受容体の可能性、を条件に絞り込んだ。

一方、無性生殖阻害物質の作用機構の解析では、lycoside 類および genistein の投与群と対照群で RNA-Seq 解析を行い、発現レベルが低下した遺伝子群から無性生殖 (遊走子嚢形成) に係る遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) 交配ホルモン生合成遺伝子

実験に先立ち、生合成酵素がシトクローム P450 (CYP) であるとの予想を裏付けるため、各種 CYP 阻害剤を A1, A2 交配型に投与することでホルモン生産性の変化を調べた。その結果、fluconazole が両交配型でホルモン生産を阻害したことから、ホルモン生合成酵素は CYP の可能性が高いと判断した。次いで疫病菌 2 種 (*P. nicotianae* および *P. capsici*) について RNA-Seq 解析を行った結果、2 生合成遺伝子の候補が 5 つ見いだされた。このうちの 1 つ (以下 “CYP_2-1”) をエンドファイト *E. festucae* に組み込み、得られた形質転換体に phytol を投与したところ 16-hydroxyphytol が生成した。この物質 (および 11-hydroxyphytol) は、研究分担者の化学合成により生合成中間体として同定されたことから、CYP_2-1 が 2 生合成遺伝子の一つであることを示唆した。しかし、*E. festucae* 野生株に phytol を投与したところ同じ 16-hydroxyphytol が生成したことから否定された。そこで他の 4 つの CYP 遺伝子についても異種発現を行ったところ、これらの 1 つ (以下 “CYP_2-2”) を組み込んだ形質転換体が phytol を 11-hydroxyphytol に変換したことから、CYP_2-2 が 2 生合成酵素の 1 つであると結論した。なお、前述のように宿主自体に 16-hydroxyphytol 生合成能があることから、この形質転換体は結果的に 2 の生産が可能であった。一方、1 生合成遺伝子の明瞭な候補は見出されなかった。そこで、これら遺伝子がホルモン前駆体 (2) の存在により発現上昇すると仮定し、前駆体共存下で培養した疫病

菌体から RNA を取得し新たに RNA-seq 解析を行った。その結果、1 生合成酵素の新たな候補が見いだされたが、異種発現株に酵素活性は見出されなかった。今後、もう一つの 2 生合成遺伝子および 1 生合成遺伝子の同定が待たれる。

(2) 交配ホルモン受容体

RNA-Seq 解析における絞込みは、(1) A1, A2 交配型はゲノムに両受容体遺伝子を有しこれらの配列は類似しており交配型は発現レベルの差で決まる、(2) 1 交配ホルモンの高い脂溶性から受容体が核内受容体スーパーファミリー(リガンドと DNA の結合配列をもつ)に属する、と仮定し行った。最終的に 1 つの受容体ペア(94%相同性)が見出され、2 受容体候補は A1 交配型で 4 倍以上高く発現し、1 受容体候補は A2 交配型のみで発現していた。今後、遺伝子ノックアウト・ノックダウンによる証明実験が必要である。以上の遺伝子発現解析実験と並行して遺伝学的アプローチによる受容体探索も進めた。すなわち、A1-A2 の交配で得られた F1 世代の自家受精、または自家受精可能なホモタリク種の F1 世代から A1, A2 交配型株を複数作出し、次世代シーケンス解析により交配型特異的発現遺伝子を特定するものである。その結果、ホモタリク種の F1 株を約 40 取得した。今後は交配型の決定を行い、同じ交配型を集めてゲノムシーケンスを行う予定である。

(3) 無性生殖の阻害物質の作用機構

関連研究として、農作物に短期的被害を与える無性生殖の阻害物質(lycoside 類とフラボノイド、図 3)について、化学合成と構造活性相関を調べ、活性に重要な構造要素を明らかにした。さらに RNA-Seq による作用機構の解析を行い、lycoside 類により Δ^1 -pyrrolidine-5-carboxylate synthetase(プロリン生合成遺伝子の 1 つ)等 4 つの孢子形成関連遺伝子が、genistein により E3 ligases や protein kinase などの細胞周期関連遺伝子が、特に強く発現制御を受けていることが分かった。これらの成果は将来の疫病菌防除に有用な示唆を提供するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ariyoshi, Suguru; Imazu, Yusuke; Ohguri, Ryuji; Katsuta, Ryo; Yajima, Arata; Shibata, Takahiro; Ojika, Makoto	4. 巻 85
2. 論文標題 Identification of biosynthetic intermediates for the mating hormone 2 of the plant pathogen Phytophthora	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, biotechnology, and biochemistry	6. 最初と最後の頁 1802-1808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小鹿 一	4. 巻 58
2. 論文標題 疫病菌と交配ホルモンの科学 作物病害を引き起こす微生物の性を科学する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 549-554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.58.549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 小鹿 一	4. 巻 58
2. 論文標題 疫病菌と交配ホルモンの科学	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takemoto, Daigo; Shibata, Yusuke; Ojika, Makoto; Mizuno, Yuri; Imano, Sayaka; Ohtsu, Mina; Sato, Ikuo; Chiba, Sotaro; Kawakita, Kazuhito; Rin, Soriya; Maurizio Camagna	4. 巻 84
2. 論文標題 Resistance to Phytophthora infestans: exploring genes required for disease resistance in Solanaceae plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Gen. Plant Pathol.	6. 最初と最後の頁 312-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-018-0801-8. 20180710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fumika Kato, Yuka Ando, Aiko Tanaka, Takamasa Suzuki, Daigo Takemoto, Makoto Ojika	4. 巻 70
2. 論文標題 Inhibitors of Asexual Reproduction of the Plant Pathogen Phytophthora from Tomato Juice: Structure-activity Relationships and Transcriptome Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Agric. Food Chem.	6. 最初と最後の頁 12878-12884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.2c05556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumika Kato, Yuka Ando, Aiko Tanaka, Takamasa Suzuki, Daigo Takemoto, and Makoto Ojika	4. 巻 87
2. 論文標題 Synthesis of aglycones, structure-activity relationships, and mode of action of lycosides as inhibitors of the asexual reproduction of Phytophthora	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 208-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 小鹿 一
2. 発表標題 植物耐病性に関わる植物-微生物相互作用分子
3. 学会等名 農芸化学会2022年度大会、シンポジウム「アグリケミカルバイオロジー」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今津佑介、有吉 俊、田中愛子、竹本大吾、小鹿 一
2. 発表標題 疫病菌交配ホルモン 2生合成遺伝子の探索
3. 学会等名 農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原功輝、米倉令恵、田中愛子、竹本大吾、鈴木孝征、小鹿 一
2. 発表標題 疫病菌交配ホルモン受容体遺伝子の探索(2)
3. 学会等名 農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto Ojika
2. 発表標題 Sexual reproduction of a plant pathogen - exploring its molecular basis -
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会特別企画「自然から学ぶ最先端生命化学 - 中西香爾先生が生命化学に遺したもの-」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤優花、加藤史華、小鹿 一
2. 発表標題 トマト由来の疫病菌無性生殖阻害物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今津佑介、有吉俊、大栗隆二、勝田亮、矢島新、小鹿一
2. 発表標題 疫病菌交配ホルモン 2の生合成中間体の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠原功輝、田中愛子、竹本大吾、小鹿一
2. 発表標題 疫病菌交配ホルモン受容体遺伝子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（博多）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有吉俊、田中愛子、竹本大吾、大栗隆二、矢島新、小鹿一
2. 発表標題 疫病菌交配ホルモン生合成遺伝子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（博多）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有吉 俊、戸村友彦、小鹿 一
2. 発表標題 病菌交配ホルモン生合成酵素の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤史華、岩井里佳、小鹿 一
2. 発表標題 疫病菌無性生殖阻害物質lycoside類に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Ojika
2. 発表標題 Chemical Control of Sexual Reproduction in the Phytopathogen Phytophthora
3. 学会等名 KU Global Center of Excellence Symposium 2019: Building Future Innovation by Multi-Creation (Kasetsart University, Thailand) (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	矢島 新 (YAJIMA Arata) (30328546)	東京農業大学・生命科学部・教授 (32658)	
研究分担者	竹本 大吾 (TAKEMOTO Daigo) (30456587)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	柴田 貴広 (SHIBATA Takahiro) (80447838)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	

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
---------	---------