

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究B  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19780038  
 研究課題名（和文） 半活物寄生性の植物病原糸状菌における感染器官の形態、機能分化の分子機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanisms underlying the control of infectious morphogenesis and function in hemi-biotrophic fungal plant pathogens  
 研究代表者  
 辻 元人 (TSUJI GENTO)  
 京都府立大学・生命環境科学研究科・講師  
 研究者番号：50381934

## 研究成果の概要（和文）：

植物病原菌の感染器官の形態分化は宿主植物への感染に必須の過程である。また病原菌は感染器官分化時に、宿主の防御反応を巧妙に抑制、回避することで感染を成立させていると考えられる。そこで感染器官分化時に発現している遺伝子の中から、宿主との相互作用に関与するタンパク質をコードする遺伝子の同定を試みた。635 種類の遺伝子の中から 49 種の分泌タンパク質遺伝子を選抜した。しかしながら、それらの中から目的と合致する遺伝子は得られなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

Differentiation of specialized infection structures in many plant pathogenic fungi is essential for the successful infection of host plants. These pathogens are expected to establish infection by avoiding host defense responses. This study was conducted to identify proteins secreted by infection structures that can play roles in interactions with host plants. Forty-nine of 635 unique genes were predicted to encode potential secreted proteins. However, none of them exhibited distinct functions in host plant.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

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：炭疽病・遺伝子・組み換え・EST・植物病原菌

## 1. 研究開始当初の背景

空気伝染性の植物病原糸状菌の多くは、宿主植物の葉上で孢子発芽をした後、感染器官である付着器を形成し、つづいて付着器から侵

入菌糸を伸長させて、宿主内へ侵入を試みる。植物病原糸状菌の感染器官の形態分化は宿主植物への感染成立に必須の過程である。申請者はこれまで、ウリ類炭疽病菌

(*Colletotrichum orbiculare*)を用いた系により、植物病原糸状菌の感染器官の1種である付着器の形態分化と機能発現の分子機構に関して研究成果を蓄積してきた。しかしながら一方で、宿主侵入後の植物組織内における感染器官の形態、機能分化の分子機構についてはほとんど明らかにできていなかった。

*Colletotrichum* 属の植物病原糸状菌の多くは一般に、その細胞生物学的知見から半活物寄生性であると考えられており、これらは宿主植物葉上で付着器を形成した後、宿主細胞を殺傷することなく侵入し、一次菌糸を分化させることにより宿主植物との間で一時的な活物寄生状態を確立する。その後一次菌糸から殺傷性の二次菌糸を分化させ、宿主細胞を崩壊させながら組織内を伸展していく。このように半活物寄生性の植物病原糸状菌は、宿主植物の葉上で感染器官の1種である付着器を分化させるだけでなく、宿主組織内においても明らかに機能の異なる2種の感染器官（一次菌糸および二次菌糸）を分化させる。宿主組織内において病原菌は、これら感染器官の形態、機能分化を高度に制御することにより、宿主の防御反応を巧妙に抑制、回避し、感染を成立させていると考えられるが、その分子機構については全くの未解明であった。

## 2. 研究の目的

これまで、植物病原糸状菌の感染器官の形態、機能分化の分子機構に関する研究としては、宿主への侵入器官である付着器をターゲットとしたものが多く、申請者を含め、世界的にも多くの知見が得られていた。しかしながら、宿主侵入後の感染器官である一次菌糸、二次菌糸のそれについて得られている知見は極めて少なかった。その理由として、宿主との相互作用を範疇に入れた感染器官分化に関する研究が機能的に進んでいないことが考えられた。そこで申請者は、アブラナ科野菜類炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*) とモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の感染系を利用することにより、宿主植物との相互作用を範疇に入れた広い視点で病原菌の感染器官を捉え、その感染成立機構の解明をめざす方向へと研究の展開を図った。アブラナ科野菜類炭疽病菌はウリ類炭疽病菌の近縁種であることから、これまで申請者が確立してきた研究手法をそのまま適用できるという利点があった。一方、シロイヌナズナは全ゲノム配列の解読が完了している有用なモデル実験植物であり、研究手法についても数多く確立されている。このような点から、本感染系を用いることによって病原菌-宿主間における相互作用の分子機構の解析をより機能的に展開できると考えられた。具体的なアプローチとしては、アブラナ科野菜類炭疽病菌の感染

器官分化時に特異的に発現している因子の探索と機能解析を行うことにより、本菌の感染成立機構、特に宿主組織内における感染器官の形態、機能分化の分子機構の解明をめざした。本研究の成果は個々の感染器官特異的発現遺伝子の機能解明によって果たされるが、それは病原菌の感染機構の理解を助ける有益な基礎情報を提供するのみならず、病害防除薬剤の開発研究の発展にも大きく貢献できるものと考えられた。

## 3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクスの手法を利用したアブラナ科野菜類炭疽病菌からのエフェクタータンパク質候補遺伝子の選抜

アブラナ科野菜類炭疽病菌の感染器官形成時 cDNA ライブラリの構築はすでに完了していた。cDNA ライブラリーの各クローンの塩基配列データを各種糸状菌 (*Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea*, *Neorospira crassa*, *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*) のゲノムデータベースを対象に BLASTX 検索し、e 値が  $1e-05$  以下の相同配列を持つものを選抜した。また相同性が見られないものでも 100 アミノ酸以上からなるポリペプチドをコードしていると思われるものについては選抜対象とした。その後、重複 cDNA を取り除いたユニークな遺伝子群について、SignalP 3.0 プログラムを用いてタンパク質の N 末端に推定シグナルペプチドを有すると予測されるものをエフェクタータンパク質候補遺伝子として選抜した。選抜の基準としては本プログラムにて、隠れマルコフモデルにより “signal peptide” と推定され、ニューラル・ネットワーク測定基準の 5 項目のうち 3 項目以上が陽性であるものをその候補とした。

(2) アブラナ科野菜類炭疽病菌における効率的な標的遺伝子破壊実験系の構築

### ① *ChKU70* オルソログの単離

*ChKU70* オルソログの単離には、degenerate PCR 法を用いた。糸状菌及び酵母のアミノ酸配列をもとに、degenerate プライマーを作成し、アブラナ科野菜類炭疽病菌 337-5 系統のゲノム DNA をテンプレートとした degenerate PCR を行った。増幅された断片をクローニングベクター pCB1004 にサブクローニングした。続いて増幅断片をプローブとしたゲノムライブラリーのスクリーニングにより、*ChKU70* オルソログ全長を含むコスミドクローンを単離した。得られたコスミドを用いたプライマーウォーキング法により *ChKU70* オルソログの塩基配列を決定した。

### ② *chku70* 破壊株の作出

*ChKU70* オルソログの塩基配列情報を利用して、2重交差の相同組み換えによる標的遺伝子破壊ベクターを構築した。アブラナ科野菜類炭疽病菌の形質転換にはアグロバクテリウム法を用いた。得られた形質転換体についてコロニーPCRによるスクリーニングを行うことにより、*chku70*破壊株を単離した。

### ③ 相同組み換え効率の評価

メラニン合成に関与する既知遺伝子 *ChPKS1* を標的遺伝子とし、*chku70*破壊株を親株とした形質転換を行った。得られた形質転換体のメラニン合成能の可視的な評価により相同組み換え効率を算出した。

### (3) ベンサミアーナ植物における一過的遺伝子発現系を利用したアブラナ科野菜類炭疽病菌エフェクタータンパク質遺伝子の探索

一過的遺伝子発現系には、ジャガイモ X ウィルス-based 発現ベクター pSfinx を利用した。候補遺伝子の完全長 cDNA をそれぞれ pSfinx のマルチクローニング部位に挿入し、一過的遺伝子発現ベクターを構築した。コントロールとして、既知の壊死斑誘導タンパク質遺伝子を導入したベクターを用いた。それらをそれぞれアグロバクテリウムに導入後、接種によりベンサミアーナ植物での一過的遺伝子発現を行った。接種一週間後の病徴を評価した。

## 4. 研究成果

本研究では、感染器官分化時 cDNA ライブラリの配列情報を利用し、バイオインフォマティクス的手法により、アブラナ科野菜類炭疽病菌における分泌タンパク質候補遺伝子を選抜した。次に、選抜した分泌タンパク質候補遺伝子の機能解析に先立ち、効率的な標的遺伝子破壊実験系の構築と評価を行った。また最後に、ベンサミアーナ植物における一過的遺伝子発現システムを用いて、エフェクタータンパク質遺伝子の探索を行った。

### (1) バイオインフォマティクス的手法を利用したアブラナ科野菜類炭疽病菌からのエフェクタータンパク質候補遺伝子の選抜

アブラナ科野菜類炭疽病菌の感染器官分化時の EST 解析によって得られている 2000 クローンの遺伝子情報より、バイオインフォマティクス的手法により、個々の遺伝子のコードするタンパク質の構造予測を行い、感染器官から植物細胞への分泌が予想されるものをエフェクタータンパク質遺伝子の候補として選抜した。その結果、635 個のユニークな遺伝子の中から 49 個の候補遺伝子の選抜に成功した。うち既知の糸状菌遺伝子との相

同性が認められたのは 35 個であった。それらの機能分類を行ったところ、遺伝子発現に関与する遺伝子が 3 遺伝子、細胞分化・信号伝達に関与する遺伝子が 7 遺伝子、代謝に関与する遺伝子 5 遺伝子、機能未知の遺伝子が 12 遺伝子であった。

### (2) アブラナ科野菜類炭疽病菌における効率的な標的遺伝子破壊実験系の構築

#### ① 標的遺伝子破壊の親株としてのアブラナ科野菜類炭疽病菌 *chku70* 破壊株の有効性の評価

一般に糸状菌の遺伝子機能を調べるためには、まず相同組換えを利用して標的遺伝子破壊株を作出し、つづいて得られた破壊株の性状解析を野生株と比較する手法が用いられている。しかしながら、本菌の標的遺伝子破壊の取得効率は 3%未満と極めて低く、効率的な標的遺伝子破壊実験系の構築が必要であることが分かった。本菌における標的遺伝子破壊効率が低い原因の一つとして、外来遺伝子のランダムなゲノム挿入に関わるとされる非相同組換え修復系が相同組換え修復系より優先的に働いていることが考えられた。そこで、アブラナ科野菜類炭疽病菌において、非相同組換え修復系を欠損させた株を作出し、得られた欠損株を標的遺伝子破壊実験の親株に用いることで、効率的な標的遺伝子破壊実験系が構築できるのではないかと考えた。アカパンカビにおいて、非相同組み換えに関与する遺伝子 *Ku70* オルソログを破壊することにより相同組み換え効率が向上するという報告がされていた。そこで、相同性を利用してオルソログを単離し、*ChKU70* と命名した。

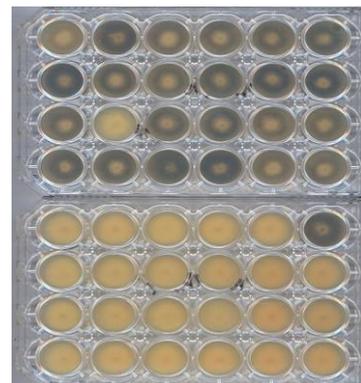


図1 アブラナ科野菜類炭疽病菌の形質転換体野生株(上)および *chku70*破壊株(下)を親株として用いた。*ChPKS1* 遺伝子を標的遺伝子とした。

次に、アブラナ科野菜類炭疽病菌 3 系統において *chku70* 破壊株を作出し、遺伝子破壊効率を測定した。2 種の標的遺伝子を用い、破壊効率を調べた結果、野生株を親株に用いた場合にはそれぞれ 2.4%、0%であったが、

*chku70* 破壊株を親株に用いた場合にはそれぞれ 97.5%、88.6%と劇的に上昇することが明らかになった。このことから本菌の効率的な遺伝子破壊株の作出に *chku70* 破壊株が有用であると考えられた (図 1)。

#### ② 2 重交差の相同組み換えによる標的遺伝子破壊に必要な相同領域長の評価

*chku70* 破壊株において標的遺伝子破壊株の作出に必要な相同領域長について調べた。相同組み換えを利用した標的遺伝子の破壊には一定の長さの標的遺伝子との相同配列を含む破壊ベクターの構築が必要となる。本菌はゲノム情報が明らかになっていないことから、より少ない情報で効率的に遺伝子破壊を行えることが望ましい。そこで、0.1kbp~2kbp の相同領域をもつ標的遺伝子破壊ベクターを構築し、その遺伝子破壊効率を調べた。その結果、相同領域が長くなるにつれ、標的遺伝子破壊効率が上昇し、効率的な破壊には 0.5kbp 以上の相同領域が必要であることが明らかになった。

#### ③ T-DNA 内の反復配列間の相同組み換えを利用した新規標的遺伝子破壊法の開発

エフェクタータンパク質候補遺伝子から実際にエフェクターとしての機能を有するものをハイスループットに選抜するためには、効率的な標的遺伝子破壊系の確立が重要である。そこで、従来の 2 重交差の相同組み換えによる標的遺伝子破壊に代わって、標的遺伝子の部分断片に隣接する T-DNA 上の反復配列間の相同組み換えを利用した標的遺伝子破壊法を開発し、DRGT (direct repeat recombination-mediated gene targeting)法と命名した。本法はバイナリーベクター pBI-GDR2 に目的遺伝子の部分断片をワンステップで導入することで標的遺伝子破壊ベクターの構築が可能となる。その簡便さから、*C. higginsianum* の遺伝子機能解析において、*chku70* 破壊株と組み合わせることで、非常に有用なツールになると考えられた。実際に本法により標的遺伝子破壊株が得られたことから、続いて 0.1kbp~1.2kbp の相同領域をもつ標的遺伝子破壊ベクターを構築し、標的遺伝子破壊に必要な相同領域長について調べた。その結果、相同領域が長くなるにつれ、標的遺伝子破壊効率が上昇し、効率的な標的遺伝子破壊を行うためには 0.5kbp 以上の相同領域が必要であることがわかった。

#### ④ 標的遺伝子破壊株の安定性の評価

DRGT 法で作出された標的遺伝子破壊株の安定性について調べた。*chku70* 破壊株由来のメラニン合成酵素遺伝子破壊株を、薬剤を含まない培地上で培養したところ、高い頻度でメ

ラニン合成復帰株が生じることがわかった (図 2)。そこで、それら復帰株についてサザンブロット解析を行ったところ、いずれも形質転換前の親株と同じバンドパターンを示した。このことから、DRGT 法で得られた標的遺伝子破壊株において、ゲノム上の薬剤耐性遺伝子の両端に必然的に形成されることになる標的遺伝子の反復配列の間で相同組み換えが生じ、ループアウトの結果として復帰株が生じやすくなっていることが示唆された。

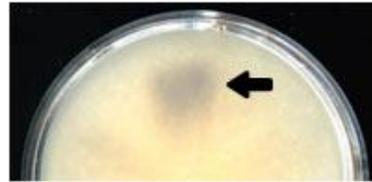


図 2 復帰株の出現

*ChPKSI* 遺伝子を標的遺伝子とした DRGT 法で得られた形質転換体。矢印の部分はメラニン合成能が復帰している。

#### (3) ベンサミアーナ植物における一過的遺伝子発現系を利用したアブラナ科野菜類炭疽病菌エフェクタータンパク質遺伝子の探索

エフェクタータンパク質候補遺伝子から実際にエフェクターとしての機能を有するものをハイスループットに選抜するために、DRGT 法を用いたハイスループットな遺伝子ターゲティング株の作出実験系の確立を試みたが、検証により DRGT 法で作出した株は形質が不安定になることが判明したことから、当該実験系による選抜を見合わせることにした。その代替として、ベンサミアーナ植物における一過的遺伝子発現系を利用したアブラナ科野菜類炭疽病菌エフェクタータンパク質遺伝子の探索を試みた。候補遺伝子の完全長 cDNA を pSfinx に組み込んで構築した一過的遺伝子発現ベクターを持つアグロバクテリウムをベンサミアーナ植物に接種した。その結果、49 個の候補遺伝子の中に、壊死斑形成を誘導するものは見られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計 5 件)

- (1) 牛丸拓磨・寺田 寛・坪井基枝・辻 元人・久保康之、アブラナ科野菜類炭疽病菌におけるアグロバクテリウム法による一重交差の相同組み換えを利用した効率的な標的遺伝子破壊実験系の構築、日本植物病理学会、2008 年 4 月 27 日、島根
- (2) 寺田 寛・森 あい・田中茂幸・辻 元人・久保康之、アブラナ科野菜類炭疽病

菌の chssd1 破壊株は物理的侵入力を有するがシロイヌナズナ Col-0 への病原性は低下する、日本植物病理学会、2008 年 4 月 27 日、島根

- (3) Hiroshi Terada・Kie Tsuboi・Takuma Ushimaru, Gento Tsuji・Yasuyuki Kubo、Development of a high throughput system for large-scale gene discovery in *Colletotrichum higginsianum* -Efficient gene targeting by *Colletotrichum higginsianum* strains deficient for *Neurospora crassa mus-51* gene homolog-, 炭疽病菌ワークショップ、2008 年 4 月 9 日、エジンバラ、英国
- (4) Hiroshi TERADA・Kie Tsuboi・Takuma Ushimaru, Gento Tsuji・Yasuyuki Kubo、Efficient genetargeting by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum higginsianum* strains deficient for *Neurospora crassa mus-51* Gene Homolog、第 9 回欧州菌遺伝学会、2008 年 4 月 7 日、エジンバラ、英国
- (5) 寺田 寛・坪井基枝・牛丸拓磨・辻 元人・久保康之、アブラナ科野菜類炭疽病菌の効率的な遺伝子ターゲティング実験系の確立、第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2007 年 11 月 15 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻 元人 (TSUJI GENTO)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師  
研究者番号：50381934

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：