

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月19日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580054

研究課題名（和文） 赤かび病菌のストレス応答シグナル伝達経路によるトリコテセン合成制御機構の解明

研究課題名（英文） Role of stress response signal transduction pathway in trichothecene production in *Fusarium graminearum*

研究代表者

藤村 真 (FUJIMURA MAKOTO)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50297735

研究成果の概要（和文）：麦類赤かび病菌のストレス応答 MAP キナーゼ (FgOS2) 経路の下流に位置すると推定される CREB 型転写因子の FgATF1 は、トリコテセン合成に必須ではないが、分化誘導を通して合成制御に関与することを明らかにした。さらに、FgOS2 経路で制御される 11 遺伝子を同定した。これらの遺伝子群には、グリセロール合成酵素、カタラーゼ、糖新生鍵酵素や細胞壁関連酵素など様々な酵素群が含まれており、本経路がストレスに応答して多様な役割を担っていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The deletion mutants of *FgATF1* gene which encodes a putative transcription factor regulated by stress response MAP kinase FgOS2 were isolated and characterized in *Fusarium graminearum*.  $\Delta$  *FgATF1* strain lack the ability to produce trichothecenes, whereas *FgATF1* deletion in an aconidial strain did not affect trichothecene production. These results suggest that FgATF1 indirectly regulates the trichothecene synthesis probably through asexual differentiation. Furthermore we identified 11 genes which are regulated under the stress response MAP kinase pathway, they included various genes such as glycerol dehydrogenase, conidial catalase, clock-controlled genes, gluconeogenesis key enzymes, and cell wall enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：赤かび病, MAP キナーゼ, cAMP, アカパンカビ

## 1. 研究開始当初の背景

麦類赤かび病の病原菌である *Fusarium graminearum* は DON や NIV などのトリコテセン系カビ毒を生産する。従って、本病害は穀類の安定生産のみならず、食の安全・安心を脅かすことから、防除に向けた様々な研究が

国内外を問わず行われている。トリコテセン合成経路の Tri 遺伝子群の多くは、染色体上にクラスターとして存在しており、その中には合成酵素遺伝子の発現を直接制御する転写因子 (Tri6) 遺伝子も含まれている。トリコテセン生産は、栄養源や環境条件など様々

な要因により変動することが報告されているが、その調節機構は必ずしも十分に明らかになっていない。

研究代表者らは、赤かび病菌のストレス応答シグナル伝達経路の MAP キナーゼカスケード遺伝子 (*FgOS4*, *FgOS5*, *FgOS2*) の破壊株を作製したところ、いずれの遺伝子破壊株もトリコテセン合成能を消失したことから、MAP キナーゼ *FgOS2* がトリコテセン合成を正に制御する重要な因子であることを明らかにした。一方、アカパンカビでは、MAP キナーゼ OS-2 の下流の主要な転写因子は CREB 型 ATF-1 であり、ストレス応答に直接関与する遺伝子とともに、分生孢子分化、概日リズム、糖新生やアミノ酸合成の調節に関わる遺伝子群を制御していることを明らかにしてきた。また、アカパンカビの cAMP-PKA (A キナーゼ) 経路は、糖源を感知して栄養成長から無性生殖 (分生孢子分化) への転換を制御しており、cAMP-PKA 経路と OS 経路にはクロストークが存在する可能性が示唆された。しかし、麦類赤かび病菌のトリコテセン合成制御に CREB 型転写因子 *FgATF1* あるいは cAMP-PKA 経路が関与するののかについては不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、赤かび病菌のトリコテセン合成にストレス応答 *FgOS2* 経路が関与していることから、①トリコテセン合成の制御に CREB 型転写因子 *FgATF1* が関与しているかを遺伝子破壊株の作製により明らかにする。また、②赤かび病菌の *FgOS2* 経路により制御される遺伝子群をアカパンカビから得られている情報を利用して同定する。

さらに、トリコテセン合成が糖源による影響を受けることから、cAMP-PKA 経路が関与するかを検証する。③cAMP-PKA 経路の活性本体である PKA 触媒ドメイン遺伝子である *FgPKAC1* の破壊株を作製し、トリコテセン生産能に影響があるかを明らかにする。また、本経路の下流で制御される遺伝子群はこれまで糸状菌ではほとんど報告がないことから、④cAMP-PKA 経路の下流で制御される遺伝子の同定を試みる。

また、本研究では、赤かび病菌はアカパンカビと比較的近縁関係にあることから、シグナル伝達経路の基礎的な研究が先行しているアカパンカビの情報を利用して、「トリコテセン合成」と「シグナル伝達経路」との関係性を明らかにすることを基本としている。この手法の有効性を検証するために、⑤各種薬剤に応答する遺伝子群を指標にして、赤かび病菌とアカパンカビ間でどの程度の共通性および多様性があるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 赤かび病菌の遺伝子破壊株の作製法

菌株は MAFF111233 株 (分生子形成欠損株) および *FgOta1* 株 (分生子形成株) を用いた。遺伝子破壊株は、相同組換え法により作製した。*FgATF1* および *FgPKAC1* 遺伝子の上流および下流領域の約 1.5kb 断片をハイグロマイシン耐性遺伝子 (*Hyg<sup>r</sup>*) に連結した遺伝子破壊用プラスミドを構築した。CMC 培地で培養した赤かび病菌の菌糸に Lysing enzyme を処理してスフェロプラスト化し、直鎖状にした遺伝子破壊用プラスミドを PEG 法により形質転換した。形質転換体は、ハイグロマイシン含有培地で選抜し、PCR 法により遺伝子破壊株であることを確認した。

### (2) トリコテセンの抽出と検出

赤かび病菌を RF 培地 (誘導培地) および YG 液体培地 (非誘導培地) で 3 日間振盪培養し、培養液からトリコテセンを酢酸エチルで抽出した。トリコテセンの検出は、TLC (酢酸エチル:トルエン=3:1) で展開後、NBP 溶液 (1% pyridine in  $\text{CHCl}_3:\text{CCl}_4$ ) を噴霧して加熱し、TEPA (10% tetraethylenepentamine in  $\text{CHCl}_3:\text{CCl}_4$ ) 溶液を用いて発色させた。

### (3) 遺伝子発現解析

赤かび病菌は YG 液体培地で 2 日間前培養し、この培養菌糸をホモゲナイザーで均一化して本培養の接種源とした。本培養は 16 時間行い、薬剤は 30 分間処理した。薬剤処理した菌体を回収して、ビードビーターで細胞を破碎し、total RNA は FastRNA Pro Red Kit (Q-BIOgene) を用いて精製した。遺伝子発現解析は、RNA を ExScript RT reagent Kit (Takara) を用いて cDNA を合成し、リアルタイム定量 PCR (LightCycler 480 Probes Master; Roche 社) を用いて行った。なお、リアルタイム PCR による定量解析は、Universal Probe (Roche 社) を用いた TaqMan 法を採用した。赤かび病菌の遺伝子は赤かび病菌のゲノムデータベース (Broad Institute) で検索し、各遺伝子のプライマーを作成した。使用した薬剤は、フルジオキソニル (1 mg/L: *FgOS2* 活性化剤)、メナジオン (50 mg/L: 酸化剤)、フルアジナム (5 mg/L: ミトコンドリア脱共役剤)、アゾキシストロピン (1 mg/L: ミトコンドリア電子伝達系阻害剤)、メトコナゾール (5 mg/L: エルゴステロール合成阻害剤) とフェンプロピモルフ (5 mg/L: エルゴステロール合成阻害剤) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ストレス応答 MAP キナーゼとトリコテセン合成制御

#### ① CREB 型転写因子 *FgATF1* 破壊株の作製

赤かび病菌のストレス応答 MAP キナーゼ *FgOS2* 遺伝子の欠損株は、トリコテセン合成能を失う。そこで、アカパンカビの MAP キナ

一ゼ OS-2 により調節される主要な転写因子 ATF-1 の赤かび病菌のオルソログ *FgATF1* を相同組み換え法により破壊した株を作製した。 $\Delta FgOS2$  株は、浸透圧感受性とフルジオキソニル感受性を示すが、 $\Delta FgATF1$ -M 株には、これらの形質は見られなかった。さらに、 $\Delta FgATF1$ -M 株のトリコテセン合成能を調べたところ、野生株と同等にトリコテセン類を生産することが TLC により検出された(図 1)。

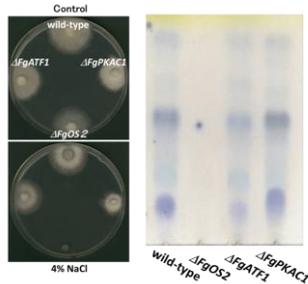


図1 *FgATF1*と*FgPKAC1*破壊株の形質とトリコテセン生産能

このことから、*FgATF1* はトリコテセン合成に直接関与しないと考えられた。しかし、アカパンカビの ATF-1 は、分生胞子形成に関わる遺伝子群を多く制御していることから、分生胞子形成が正常である *Fg0ta1* 株を親株として、改めて遺伝子破壊株( $\Delta FgATF1$ -0 株)を単離した。その結果、 $\Delta FgATF1$ -0 株はトリコテセン合成能を欠損することが明らかになった。このことから、*FgATF1* はトリコテセン合成に必須ではないが、合成調節に重要な働きをする転写因子であることが明らかになった。*FgATF1* は、分化を通してトリコテセン合成に関与していると推定される。

## ②*FgOS2* 経路により誘導される遺伝子群の同定

トリコテセン合成制御に関わる *FgOS2* 経路がどのような遺伝子群を制御しているかを調べるために、フルジオキソニルにより誘導される遺伝子を調べた。まず、赤かび病菌にフルジオキソニルを処理して、*FgOS2* が活性化されるかを、ストレス応答 MAP キナーゼ p38 の抗リン酸化抗体を用いてウエスタン法により調べた。フルジオキソニル処理により赤かび病菌の *FgOS2* は顕著にリン酸化されることが明らかになった。

そこで、アカパンカビでフルジオキソニルにより発現誘導される遺伝子の赤かび病菌のオルソログ 17 遺伝子についてリアルタイム PCR 法により解析した。その結果、解析した赤かび病菌の 17 遺伝子のうち 11 遺伝子で、赤かび病菌でもフルジオキソニルによる顕著な発現誘導が認められた。これらの遺伝子の中には、グリセロール合成に関わる *FgGCY1* と *FgCUT*、分生子特異的なカタラーゼ *FgCAT1*、

糖新生の鍵酵素 *FgFBP1*、概日リズムの出力遺伝子である *FgCCG1* と *FgCCG14*、細胞壁タンパクである *FgNCW3* と *FgEGL1* およびチロシナーゼ様 *FgTYR5* とキシロース還元酵素 *FgXYR1* 遺伝子などが含まれていた(図 2)。beta-(1,3)-glucanosyltransferase (*gel-1*) 遺伝子のように赤かび病菌では顕著な誘導が認められないものも存在するものの、ストレス応答シグナル伝達経路である *FgOS2* 経路は、赤かび病菌でも様々な機能をもつ遺伝子群を制御していることが初めて明らかになった。これらの誘導遺伝子産物は、分生胞子形成に関わるものが多く含まれている。このことから、二次代謝であるトリコテセン合成の制御は、ストレスに伴う分化誘導と関連している可能性が考えられる。

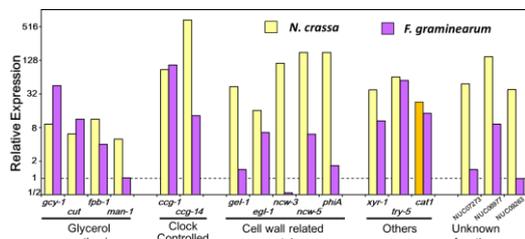


図2 赤かび病菌およびアカパンカビの*FgOS2*活性化剤により誘導される遺伝子

## (2) 赤かび病菌の cAMP-PKA 経路とトリコテセン合成制御

### ① A キナーゼ触媒サブユニット *FgPKAC1* 破壊株の作製

赤かび病菌のトリコテセン生産が糖源による制御を受けていることから、糖源を感じて応答すると考えられる cAMP-PKA 経路の関与を調べるために、A キナーゼの触媒サブユニット (*FgPKAC1*) 遺伝子のノックアウト  $\Delta FgPKAC1$ -M 株を相同組み換え法により作製した。 $\Delta FgPKAC1$ -M 株のトリコテセン合成能を調べたところ、野生株と同様にトリコテセン生産が認められた(図 1)。しかし、 $\Delta FgPKAC1$ -M 株は、分生胞子形成能を消失した株を親株として作成された株である。前述の  $\Delta FgATF1$  株の例もあることから、今後、分生子形成能を有する *Fg0ta* 株を親株とした遺伝子破壊株を作製して解析する必要があると考えられる。

### ② cAMP-PKA 経路の下流で制御される遺伝子群の探索

cAMP-PKA 経路は主要なシグナル伝達経路の一つであり様々な糸状菌で研究されているが、本経路の下流で制御されている遺伝子はこれまでほとんど報告されていない。そこで、アカパンカビの cAMP 合成酵素欠損 *cr-1* 変異株を用いて、cAMP の添加により誘導される遺伝子の探索を行った。マイクロアレイ解析により、誘導候補遺伝子を選抜したが、リアルタイム定量 PCR 解析で顕著な発現誘導が

認められた遺伝子はほとんどなく、実験手法の改善が必要であると考えられた。そこで、さらに高感度に cAMP に応答する株として、cAMP 合成酵素 CR-1 と分解酵素 PDE-2 を両方欠損した *cr-1;pde-2* 二重変異株を作製した。*cr-1;pde-2* 株は *cr-1* 株よりも 1/100 以下の濃度の cAMP に反応し、その効果が持続した (図 3)。本株を使用することにより、添加した cAMP に応答する遺伝子を cAMP-PKA 経路で制御される遺伝子として特定することが可能になると考えられる。

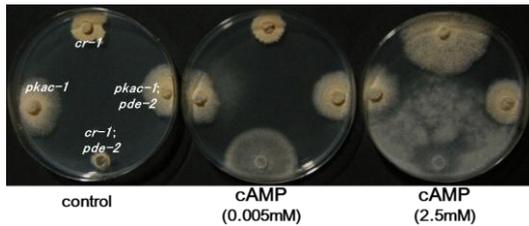


図3 *cr-1*と*pde-2*遺伝子の二重破壊によるcAMP高感受性株の作出

### (3) 赤かび病菌の殺菌剤により誘導される遺伝子の同定

cAMP-PKA 経路がトリコテセン合成に関与しておらず、その形質もアカパンカビとは大きく異なった。このことから、当初計画書の予想どおりにいかなかった場合の対応に従い、cAMP-PKA 経路関連の研究を縮小し、本研究の出発点となった「アカパンカビ」と「赤かび病菌」の制御遺伝子の共通性と相異性を詳細に解析した。

赤かび病の防除には、エルゴステロール合成阻害剤 (EBI 剤) やミトコンドリア電子伝達系阻害剤 (QoI 剤) が使用されているが、トリコテセン合成に影響する可能性があることが一部報告されている。本実験で用いた 6 種類の殺菌剤では、トリコテセン合成に顕著な影響は見られなかったが、各種殺菌剤で誘導される遺伝子を同定した。

#### ①メナジオン (酸化剤) に応答する遺伝子

アカパンカビの 17 種類のメナジオン誘導遺伝子について、赤かび病菌で解析した。その結果、試験した赤かび病菌の 17 種類のオルソログ遺伝子のうち 12 遺伝子が赤かび病菌でも顕著にメナジオンで誘導された。これらの遺伝子には、機能や細胞内局在性が異なる複数種の glutathione S-transferase 遺伝子や多様な oxidoreductase 遺伝子が含まれていた。酸化的ストレスに応答する遺伝子群は、アカパンカビと赤かび病菌で共通性が比較的高いことが明らかになった。

#### ②フルアジナムに応答する遺伝子

ミトコンドリアの電子伝達系と酸化的リン酸化を脱共役するフルアジナムに応答する遺伝子はこれまで報告されていない。そこで、アカパンカビにフルアジナム処理をおこ

ない、マイクロアレイにより誘導遺伝子を探索した。その結果、メナジオン誘導遺伝子が顕著にフルアジナム処理でも誘導されることが明らかになった。誘導機構はメナジオンと同様に転写因子 NAP-1 が関与していた。赤かび病菌でもフルアジナムおよび脱共役剤である CCCP でメナジオン誘導遺伝子 (glutathione S-transferase 遺伝子や oxidoreductase 遺伝子) のほとんどが顕著に誘導された。フルアジナムは酸化ストレスを発生させていると考えられる。なお、アゾキシストロビンではシアン耐性呼吸 *FgAOD1* 遺伝子が赤かび病菌でも認められた。

#### ③エルゴステロール合成阻害剤に応答する遺伝子

エルゴステロール合成阻害剤により、合成酵素 *ERG* 遺伝子が誘導されることが多くの糸状菌で報告されている。そこで、異なる作用点をもつメトコナゾール (C14 demethylase *ERG11* 阻害剤) とフェンプロピモルフ ( $\Delta 14$ -reductase *ERG24* および  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -isomerase *ERG3* の阻害剤) がエルゴステロール合成酵素遺伝子 (21 種類 *ERG* 遺伝子) の発現に与える影響について解析した。その結果、アカパンカビでは、メトコナゾールは *ERG11* と *ERG6* 遺伝子の発現を誘導し、フェンプロピモルフは *ERG24* と *ERG3* 遺伝子を誘導した。これらは、それぞれの薬剤の標的酵素遺伝子であった。また、フェンプロピモルフによる *ERG* 遺伝子の誘導は転写因子 SAH-2 により制御されることを見いだした。一方、赤かび病でも *ERG* 遺伝子の誘導が認められたが、両方の薬剤により共通に *ERG11*、*ERG6*、*ERG3* および *ERG24* 遺伝子が誘導され、アカパンカビのように薬剤による特異性は認められなかった。

以上から、赤かび病菌とアカパンカビは分類上も比較的近縁であり、相違点はあるものの殺菌剤に対する応答に高い共通性があることが明らかになった。なお、本実験により発現誘導が確認された遺伝子のほとんどは赤かび病菌でこれまで報告をされておらず、初めての報告である。

### 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 1 件)

① Masayuki Kamei, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Fumiyasu Fukumori, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura (2013). Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanosyltransferase genes in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol 52, 65-72.

http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.12.001, 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

① Chika Kurata, Masayuki Kamei, Setsuko Watanabe, Shinpei Banno, Makoto Fujimura: Deletion of cAMP phosphodiesterase *pde-2/acon-2* gene causes the enhanced osmotic sensitivity in *os-1* and *os-2* mutants of *N. crassa*. The 27th Fungal Genetics Conference, March 14 2013, Aslioma, USA

②加賀谷奏、山下和宏、高橋正和、亀井誠之、一石昭彦、藤村真: アカパンカビ OS-2 MAP キナーゼによる細胞壁局在タンパク質の制御 第 12 回糸状菌分子生物学コンファレンス、ウイックあいち(名古屋)平成 24 年 11 月 12 日

③ Makoto Fujimura, Kazuhiro Yamashita, Masakazu Takahashi, Masayuki Kamei, Moto Miyashita: Comparative transcriptional profiling of *Neurospora crassa* and *Fusarium graminearum* in response to fungicides. 5th Pan-Pacific Conference of Pesticide Science, Sept. 18 2012, Beijing, China.

④ Masakazu Takahashi, Shinpei Banno, Makoto Fujimura: Fluazinam induced the glutathione S-transferase genes and oxidoreductases genes in transcription factor NAP-1-dependent and -independent manner in *Neurospora crassa*. 5th Pan-Pacific Conference of Pesticide Science, Sept. 18 2012, Beijing, China.

⑤ Masayuki Kamei, Masakazu Takahashi, Akihiko Ichiishi, Makoto Fujimura: Contribution of MAK-1 and MAK-2 MAP kinases to cell wall integrity in *Neurospora crassa*. 11th European Conference of Fungal Genetics, March 31 2012, Marburg, Germany

⑥ 藤村真: 糸状菌のシグナル伝達経路の薬剤応答と機能分化 第 15 回農薬相模セミナー、相模中央化学研究所(神奈川)、平成 23 年 1 月 6 日

⑦ 齋須秀昭、山下和宏、高橋正和、亀井誠之、木村 真、藤村真: 赤かび病菌の CREB 型転写因子 FgATF1 破壊株の単離とその解析 第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス、広島大学(広島)、平成 22 年 11 月 19 日

⑧ 齋須秀昭、高橋正和、亀井誠之、藤村真: 赤かび病菌におけるアカパンカビ薬剤誘導遺伝子の発現解析 日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会、東洋大学板倉キャンパス(群馬県)、平成 22 年 10 月 15 日

〔図書〕(計 1 件)

① Masayuki Kamei, Masakazu Takahashi, Shinpei Banno, Akihiko Ichiishi, Fumiyasu Fukumori, Makoto Fujimura (2013) Regulation and physiological function of MAP kinase and cAMP-PKA pathways In: *Neurospora: Genomics and Molecular Biology*. D. Kasbekar & K. McCluskey (eds). Norwich, UK: Horizon Scientific Press and Caister Academic Press, pp. 171-192.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤村 真 (FUJIMURA MAKOTO)  
東洋大学・生命科学部・教授  
研究者番号: 50297735

(2) 研究分担者 (0)

(3) 連携研究者 (0)