

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 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780067

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の光センシングに関わる光受容体の解明と光応答の多様性に関する研究

研究課題名（英文）Studies on elucidation of photoreceptors for photosensing and diversity of photoresponse in phytopathogenic fungi

研究代表者

木原 淳一（KIHARA JUNICHI）

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40294368

研究成果の概要（和文）：イネごま葉枯病菌を用いて、光形態形成に関与すると考えられるフィトクロム様光受容体遺伝子、クリプトクロム様光受容体遺伝子、VeA 遺伝子、及び、LaeA 遺伝子のクローニングと機能解析を行なった。また、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成を促進する糸状菌を新たに発見するとともに、キュウリ褐斑病菌においても、イネごま葉枯病菌と同様にメラニン合成系遺伝子の発現が近紫外線照射によって増加することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Photomorphogenesis-related genes, Phytochrome-like gene, Cryptochrome-like gene, VeA gene, and LaeA gene, were identified and characterized in the rice brown spot fungus *Bipolaris oryzae*. Conidiation-promoting fungus against *B. oryzae* was identified. In addition, expression of melanin biosynthesis genes was enhanced by near-ultraviolet irradiation of *Corynespora* leaf spot fungus *Corynespora cassicola* as well as *B. oryzae*.

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	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：植物病原糸状菌・光受容体・紫外線・光応答・メラニン・孢子形成・遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

地球上で生産可能な食糧の約 12%が、毎年、植物の病気（植物病）によって失われている。近年、生物多様性に配慮した農業生産や、食の安全・安心のニーズから、化学農薬だけに依存しない、新しい作物保護技術の開発が求められている。

研究代表者は、現在、光を利用した植物保護技術の開発を目指して研究を行っている。

そのためには、「植物」及び「植物病原糸状菌」の双方において、光が及ぼす影響やそのメカニズムを明らかにする必要がある。植物は、自らの生長を制御するための環境情報のひとつとして光を利用しており、光センシング（光受容）に関する光受容体として赤色光受容体（フィトクロム）や青色光受容体（クリプトクロム・フォトトロピン）の存在が知られている。

一方、光とは縁がないと考えられる糸状菌においても、孢子形成や色素形成等の光形態形成が青色光や紫外線によって調節される現象が数多く報告されてきた。

イネごま葉枯病菌 *Bipolaris oryzae* の孢子形成は、紫外線によって誘導されるが、その反応は青色光によって阻害されるというユニークな拮抗的光反応によって調節される。この拮抗的光反応は、日中の光のバランスで孢子形成量を調節し、さらに宿主であるイネに感染しやすい夜間に孢子を形成するために、イネごま葉枯病菌が独自に獲得した光形態形成のひとつと考えられているが、この反応に関わる光受容体については未解明であった。近年、ゲノムシークエンスからの解析によって、糸状菌にも、植物のフィトクロムやクリプトクロムに類似した光受容体タンパク質を持っていることが *Aspergillus* 属菌等で報告されている。しかしながら、イネごま葉枯病菌においては、これら光受容体の存在は知られていなかった。

一方、イネごま葉枯病菌をモデルとして、近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子の探索及び発現解析を行ってきた結果、メラニン合成系遺伝子をはじめとする 50 以上の新規紫外線誘導遺伝子の存在を明らかにしてきた。しかしながら、イネごま葉枯病菌以外の植物病原糸状菌においても、近紫外線照射によってメラニン合成系遺伝子の発現が増加するかについては検討されてこなかった。

2. 研究の目的

光を利用した「植物病原糸状菌」側からの新しい植物保護技術を開発する糸口を導き出すためには、植物病原糸状菌が光環境を認識するための光センシングに関わる光受容体を明らかにするとともに、植物病原糸状菌における光反応の多様性を明らかにする必要があると考える。そこで、本研究では、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- ① イネごま葉枯病菌から、光受容体と推定されるフィトクロム様光受容体遺伝子、クリプトクロム様光受容体遺伝子、光受容体の足場タンパク質をコードすると考えられている VeA 遺伝子、及び、その下流の二次代謝制御因子をコードすると考えられる LaeA 遺伝子をクローニングするとともに、遺伝子破壊株を作出し、機能解析を行なう。
- ② イネごま葉枯病菌の分生孢子形成に影響を及ぼす光以外の因子を探索する。
- ③ イネごま葉枯病菌以外の植物病原糸状菌で、メラニン合成系遺伝子の発現が近紫外線照射によって増加するかを確認する。
- ④ 分子生物学的解析があまり行なわれていないキュウリ褐斑病菌を用いて、メラニン合成系遺伝子の機能解析を行なう。

3. 研究の方法

1) アグロバクテリウムを用いた形質転換
バイナリーベクターとして、pCAMBIA-Bar-RfA を、アグロバクテリウム株として、EHA105 及び AGL1 を用いた。イネいもち病菌またはイネごま葉枯病菌の分生孢子を PDA 培地上の濾紙に塗布し、アグロバクテリウムとの共培養後、ハイグロマイシン薬剤耐性による選抜を行なった。共培養時の温度や時間についても検討を行った。

2) 発光ダイオードを用いた光応答の解析
ジャガイモ煎汁 PDA 培地に供試菌を移植し、卓上人工気象器（日本医科器械・LH-70LED-DT）を用いて、青・緑・赤の LED 光を照射し、菌叢生育や孢子形成等の各種性状解析を行なった。メラニン合成系遺伝子の発現定量解析は、各糸状菌のメラニン合成系遺伝子に特異的なプライマーを用いて、各種光条件で培養した菌体から抽出・合成した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR により行なった。

3) 光センシング関連遺伝子のクローニング
糸状菌で既知の遺伝子配列をもとにプライマーを作成し、PCR による遺伝子の増幅とシークエンスを行なった。また、RACE 法により、それぞれの mRNA の 5' 末端及び 3' 末端を決定した。また、得られた塩基配列をもとに、DDBJ データベースを用いた相同検索を行なった。

4) 遺伝子破壊株の作出と解析

イネごま葉枯病菌の発芽分生孢子から作成したプロトプラストとベクターをポリエチレングリコールとともにインキュベートし、再生培地に塗布後、ハイグロマイシン含有培地上で、形質転換体のスクリーニングを行なった。遺伝子破壊の有無を調査し、目的遺伝子破壊株の各種性状解析を行なった。

5) 分生孢子形成を促進する因子の探索

イネごま葉枯病菌との対峙培養によって、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成を促進する糸状菌の探索を行なった。rDNA の ITS 領域のシークエンスにより、種の同定を行なった。また、培養ろ液を用いた孢子形成促進物質の抽出も試みた。

6) キュウリ褐斑病菌のメラニン合成遺伝子

キュウリ褐斑病菌から、糸状菌で既知のメラニン合成系遺伝子の遺伝子配列をもとにプライマーを作成し、PCR により、*SCD1* 遺伝子及び *THR1* 遺伝子のクローニングを行なった。遺伝子破壊株の作出は、イネごま葉枯病菌と同様に行ない、サザン解析により、遺伝子破壊株の確認を行なった。菌叢生育・分生孢子形成などの性状解析を行なった。

4. 研究成果

1) アグロバクテリウムを用いた形質転換

複数のアグロバクテリウム株を用いて、様々な共培養条件のもとで、アグロバクテリウムを用いた形質転換について検討を行なった。イネいもち病菌では、多くの形質転換体を得たのに対して、イネごま葉枯病菌では、アグロバクテリウムを用いた形質転換体はまったく得られなかった。したがって、イネごま葉枯病菌においては、アグロバクテリウムを用いた形質転換は困難であり、従来どおり、PEG法を用いた形質転換が適していることが示された。

2) 発光ダイオードを用いた光応答の解析

発光ダイオード(LED)を用いた光応答の解析系を確立し、植物病原糸状菌における菌叢生育・孢子形成・色素形成等の形態的特徴について調査を行なった。特筆すべき点として、各種植物病原糸状菌における光応答を、メラニン合成系遺伝子を指標にして解析した結果、イネごま葉枯病菌だけでなく、イネいもち病菌、キュウリ褐斑病菌、キュウリ炭そ病菌のいずれの植物病原糸状菌においても、メラニン合成系遺伝子の発現が、近紫外線によって増加することを確認した(図1)。以上の結果から、紫外線受容体及び紫外線による光形態形成は、植物病原糸状菌に幅広く存在することが示唆された。

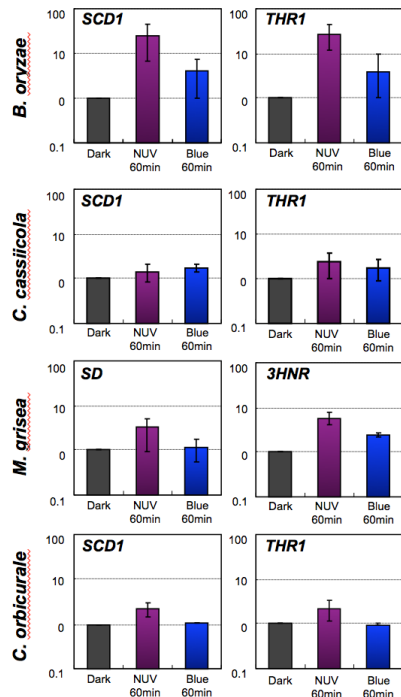


図1 各種病原糸状菌におけるメラニン合成系遺伝子の発現解析

Dark: コントロール(暗黒培養)

NUV: 近紫外線照射(60分)

Blue: 青色光照射(60分)

3) 光センシング関連遺伝子のクローニング
イネごま葉枯病菌では、これまでに、青色光受容体遺伝子、及び、オプシン様光受容体遺伝子をクローニングしている。これらに加えて、イネごま葉枯病菌から、下記の光センシング関連遺伝子のクローニングを行なった。

① フィトクロム様光受容体遺伝子 (*BoPHY1*)
フィトクロムは、植物の赤色光・遠赤色光受容体として知られている。このフィトクロムと類似している約4kbの遺伝子をクローニングした。

② クリプトクロム様光受容体遺伝子 (*BoCRY1*)
クリプトクロムは、植物の青色光受容体として知られている。このクリプトクロムと類似している約2.4kbの遺伝子をクローニングした。

③ VeA遺伝子 (*BoVeA*)
Velvetタンパク質 (VeA) は、糸状菌の光受容体の足場タンパク質と考えられている。このVeAをコードしていると考えられる約2kbの遺伝子をクローニングした。

④ LaeA遺伝子 (*BoLaeA*)
LaeAタンパク質 (LaeA) は、糸状菌の二次代謝制御因子と考えられている。このLaeAをコードしていると考えられる約1.3kbの遺伝子をクローニングした。

4) 遺伝子破壊株の作出と解析

イネごま葉枯病菌からクローニングした、光センシングに関係すると思われる①フィトクロム様光受容体遺伝子 (*BoPHY1*)、②クリプトクロム様光受容体遺伝子 (*BoCRY1*)、③光受容体の足場タンパク質と考えられるVeAの遺伝子 (*BoVeA*)、及び、④その下流の二次代謝制御因子と考えられるLaeAの遺伝子 (*BoLaeA*)の機能解析を行なうため、PEG法を用いた遺伝子相同置換による遺伝子破壊実験を行なった。その結果、すべての遺伝子破壊株の作出に成功した。これら遺伝子破壊株の性状解析を行なった結果、*BoCRY1*遺伝子破壊株では菌叢生育が顕著に遅くなること、また、野生株がCM培地上で偽子のう殻様の黒い構造物を多数形成するのに対して、*BoCRY1*遺伝子破壊株では形成されないといった差異が示された。*BoPHY1*遺伝子破壊株では、暗黒培養において、野生株では通常形成されない偽子のう殻様の黒い構造物が多数形成されたことから、*BoCRY1*遺伝子と*BoPHY1*遺伝子がともに有性生殖に関与することが示された。一方、分生孢子形成については、野生株と比較して、分生孢子形成数に有意に差が見られるものもあったが、分生孢子形成誘導に紫外線が必要である点は野生株とは変わらなかった。このことから、紫外線による分生孢子形成誘導にこれら遺伝子は直接関与しておらず、紫外線センシングに関与する未知の紫外線受容体が存在することが推察された。

5) 分生孢子形成を促進する因子の探索

イネごま葉枯病菌との対峙培養によって、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成を有意に促進する糸状菌 (D1 菌株) を得た。rDNA の ITS 領域の塩基配列から、D1 菌は、*Diaporthe* sp. であると推察された。対峙培養を行った場合、D1 菌株コロニーと接触する周辺で、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成が有意に増加した (図 2)。この現象は、イネごま葉枯病菌と D1 菌株のそれぞれの菌糸が直接接触していなくても認められた。さらに、D1 菌株を各種液体培地で培養後、ろ過滅菌した培養ろ液をペーパーディスクに滴下し、このペーパーディスクとイネごま葉枯病菌を対峙培養した結果、コントロールと比較して、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成が有意に増加した。以上の結果から、D1 菌株によって分泌される熱安定性の何らかの物質が、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成を促進することが考えられた。

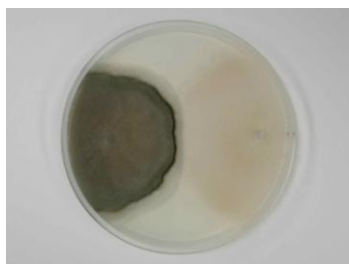


図 2 分生孢子形成を促進する糸状菌
左：イネごま葉枯病菌；右：D1 菌
D1 菌との境界部分で、イネごま葉枯病菌のコロニー周辺が多数の分生孢子形成により黒色を示している。

6) キュウリ褐斑病菌のメラニン合成遺伝子

キュウリ褐斑病菌を用いて、相同組換えによりメラニン生合成遺伝子破壊株を作成し、キュウリ褐斑病菌におけるメラニン生合成遺伝子の機能解析を行なった。

キュウリ褐斑病菌のメラニン生合成遺伝子であるシタロン脱水酵素遺伝子 (*SCD1* 遺伝子) 及び 1, 3, 8-トリヒドロキシナフトレン還元酵素遺伝子 (*THR1* 遺伝子) の破壊株は、野生株と比較して、どちらもアルビノの表現型を示した (図 3)。興味深いことに、両遺伝子破壊株の分生孢子は、野生株と比較して有意



図 3 キュウリ褐斑病菌のメラニン合成系遺伝子破壊株
写真左：THR1 遺伝子 写真右：SCD1 遺伝子
上側は野生株、下側は遺伝子破壊株

に小さくなった。さらに、分生孢子懸濁液をキュウリ葉に滴下接種した結果、両遺伝子破壊株では付着器を形成したにも関わらず、野生株と比較して小さい病斑を形成した。一方、イネごま葉枯病菌の *SCD1* 遺伝子を導入したキュウリ褐斑病菌の *SCD1* 遺伝子破壊株の表現型は、キュウリ褐斑病菌の野生株の表現型へと回復したことから、キュウリ褐斑病菌の *SCD1* 遺伝子の機能は、イネごま葉枯病菌の *SCD1* 遺伝子で相補可能であることが示された。以上の結果から、キュウリ褐斑病菌では、他の糸状菌のメラニン生合成遺伝子の機能と類似しているものの、他の糸状菌とは異なり、メラニンが分生孢子的サイズと病斑形成に関与している可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 春木洋平・上野誠・荒瀬榮・木原淳一、キュウリ褐斑病菌のメラニン生合成遺伝子の機能解析、平成 24 年度島根病害虫研究会研究発表会、2013 年 3 月 18 日、島根大学 (松江市)
- ② 大西雄介・上野誠・荒瀬榮・木原淳一、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成を促進する糸状菌 *Phomopsis* sp. (*Diaporthe* sp.)、第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2011 年 11 月 17 日、東京大学 (東京都文京区)
- ③ 池島裕輔・上野誠・荒瀬榮・木原淳一、近紫外線照射とメラニン合成阻害剤が植物病原糸状菌のメラニン生合成遺伝子の発現に及ぼす影響、平成 23 年度日本植物病理学会大会、2011 年 3 月 27 日、東京農工大学府中キャンパス (東京都府中市)
- ④ 池島裕輔・上野誠・荒瀬榮・木原淳一、近紫外線照射が数種植物病原糸状菌のメラニン生合成遺伝子の発現に及ぼす影響、第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス、2010 年 11 月 19 日、広島大学 (東広島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 淳一 (KIHARA JUNICHI)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：40294368

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：