

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688006

研究課題名(和文)糸状菌の病原性発現過程におけるポラリソームと活性酸素生成複合体のダイナミクス

研究課題名(英文)Dynamics of polarisome and ROS generating complex during pathogenic development of fungi

研究代表者

池田 健一(Ikeda, Kenichi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40437504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円、(間接経費) 6,090,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、付着器底部に生成される活性酸素の生成源となるNADPH oxidase (Nox)遺伝子の機能解析を行った。NoxはNoxAおよびNoxBの2コピーが存在し、NoxBのみが宿主侵入に関わっていた。Noxの発現パターン、細胞内局在性、ポラリソーム形成への影響などについて評価したところ、NoxBは付着器形成に伴って発現誘導され、付着器にそのタンパク質局在が認められた。また、noxBの欠損に伴い、付着器におけるアクチンの集積様式が攪乱された。さらに、Noxと相互作用するRacAの機能解析を行い、racAを欠損することにより、菌糸生育に多面的な異常が認められ病原性も喪失していた。

研究成果の概要(英文)：This study was evaluated the functional mechanism of NADPH oxidase (Nox) during host penetration. In black spot disease, two Nox homologues, NoxA and NoxB are present and only the NoxB was involved in host penetration. Therefore, we evaluated the expression pattern and localization of Nox(s). The expression of Nox were induced during spore germination. NoxB protein was localized at the appressorium. The disruption of noxB resulted in disorder of actin accumulation at the appressorium. Moreover, NoxB was interacted with RacA. The disruption mutant of racA was affected multiple hyphal growth stages and lost pathogenicity.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学・病害防除

キーワード：糸状菌 病原性 侵入力 活性酸素 ポラリソーム NADPH oxidase

1. 研究開始当初の背景

植物病害の防除戦略を考える上では、病原体の感染戦略すなわち病原性発現機構を理解する必要がある。これまでに多くの研究者により、病原性に関わる遺伝子について多くの研究成果が得られている。変異体ライブラリーなどの解析より、病原性喪失菌株が多数見出されているが、それらの多くは、病原性ばかりではなく、形態形成や増殖能力など多面的な影響を及ぼしているものが多く、直接的な病原性関与遺伝子とは言い難いものが多い。

我々は、普遍性の高い病原性因子を明らかにするために、植物病原糸状菌が孢子より宿主植物へ感染する過程について、3つのステージに区分して解析を行ってきた。すなわち、

(1) 宿主葉上で孢子が発芽する間に宿主表面へ強固に接着する過程、(2) 病原体の菌糸先端領域が形態変化し宿主細胞へ侵入する過程、(3) 侵入した病原体菌糸が宿主植物との相互作用により感染を成立させる過程、である。

本研究で着目した、宿主植物への侵入過程については、付着器の形成能力に着目した研究事例が多い。我々は、付着器形成とは異なる視点より解析を試みている。ナシ黒斑病菌の菌糸先端領域では活性酸素種 (ROS) が生成されていることが明らかとなり、その局在性を電子顕微鏡で明らかにしたところ、付着器直下の病原菌と宿主植物の接点において特異的に ROS が生成されていた。このことより、宿主侵入の際に ROS の生成が重要であることが示唆され、アスコルビン酸や NADPH オキシダーゼ (Nox) 阻害剤などを用いて ROS を消去したところ、病斑形成能力が喪失した。我々は、宿主侵入に関わる病原性因子として、ROS にスポットを当て、ROS 生成に関わる遺伝子 *Nox* の機能解析を進めた。

2. 研究の目的

Nox の機能解析を進めた結果、ナシ黒斑病菌には *Nox* が 2 コピー (*NoxA*, *NoxB*) 存在し、その中でも、*NoxB* のみが宿主侵入に関与していることが明らかとされた。さらに、*Nox* を機能破壊すると、菌糸分岐頻度が増加し、菌糸の極性に影響を及ぼすことが考えられた。ここで、4つの新たな疑問が生じた。

(1) *NoxA* と *NoxB* は、それぞれ異なる ROS 生成複合体を構成しているのか？ (2) *Nox* 遺伝子とその他 ROS 生成複合体構成因子の発現はどのように制御されているのか？

(3) 先端領域複合体ポラリソームと ROS 生成複合体は共存するのか？ (4) それぞれの複合体は病原性を発揮する際にどのようなダイナミクスが働くのか？である。

本研究においては、これら疑問を解明するために、菌糸先端領域の各種複合体の局在性のダイナミクスと、それら構成因子の遺伝子発現パターンについて解明し、病原性発現機構の重要なポイントである宿主侵入能力を

生み出す仕組みを明らかとする。

3. 研究の方法

(1) *racA* 遺伝子破壊株の特性評価

Nox と相互作用し、それらの機能調節を行うと考えられる *RacA* のホモログをナシ黒斑病菌より単離し、それを破壊した変異株の表現型を評価し、*RacA* の機能解析を行う。

(2) *NoxA*, *NoxB*, *RacA* 遺伝子の発現パターンの解明

ROS 生成に関わる *NoxA*, *NoxB* はそれぞれ菌糸分岐の制御に関わっていたが、*NoxB* のみが宿主侵入に関与していた。それぞれの *Nox* 遺伝子が異なる発現制御下にあるのか明らかとする。さらに、これら *Nox* と結合し、機能調節を行っていると考えられる *RacA* についてもその発現パターンを評価した。本研究では、孢子発芽菌糸と栄養生長菌糸という異なる発生段階と、セルロース人工膜上および宿主植物という異なる基質条件、さらに富栄養・貧栄養条件で生育した菌糸を採集し、RNA 抽出を行った。得られた RNA より cDNA を合成し、定量的 RT-PCR を行った。

(3) *NoxA*, *NoxB* 遺伝子産物の局在性評価 (蛍光顕微鏡レベル)

NoxA および *NoxB* 遺伝子産物の発現パターンおよび局在性を明らかにするために、それぞれの *Nox* 遺伝子の C 末端領域に GFP 等の蛍光タンパク質遺伝子をつないだ *Nox* レポータープラスミドを作製し、それぞれのプラスミドを *NoxA*, *NoxB* それぞれの欠失変異体へ導入した。それぞれの *Nox* 蛍光標識変異体が、それぞれの欠失変異形質を相補し、野生株の *Nox* と同様の機能を有しているのか確認する。得られた *Nox* 蛍光標識変異体を孢子発芽させ、蛍光顕微鏡観察を行うことで、*NoxA*, *NoxB* がどのような局在性を示すのか評価した。

(4) 光学顕微鏡による O_2^- , H_2O_2 シグナルの検出

O_2^- の検出は、試料を 0.05% nitro blue tetrazolium (NBT) を含む 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に浸漬し、1 時間静置させた。試料がナシ葉の場合にのみエタノール：酢酸溶液による脱色を行い、50%グリセロール溶液でスライドガラスに封入し、光学顕微鏡により観察を行った。 H_2O_2 の検出は、試料を 0.1% 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) を含む DW に浸漬し、8 時間静置した後に観察した。

(5) 透過型電子顕微鏡による H_2O_2 シグナルの検出

電子顕微鏡下での H_2O_2 の検出は Bestwick *et al.* (1997) の方法に従って行った。5mM $CeCl_3$ を減圧浸透後に 1 時間反応させた後に化学固定を行い、Spurr 樹脂に包埋重合させた。重合したブロックは、超薄切片を作製し、

透過型電子顕微鏡観察を行った。

(6) アクチン結合性ペプチド LifeAct-EGFP, LifeAct-TagRFP を用いたアクチン局在性解析

P_{trpC} プロモーター制御下において LifeAct-EGFP を発現させることで、細胞内のアクチンの可視化を試みた。ナシ黒斑病菌の *LifeAct* 配列については、*Neurospora crassa* のコドン使用頻度に最適化した *LifeAct* のオリゴヌクレオチド配列、5'-ATGGGCGTTCGCTGACCTCATCAAGAA GTTCGAGTCCATCTCCAAGGAGGAG-3' を合成した。この配列と蛍光タンパク質を融合させるために、In Fusion HD Cloning Kit を用いた。蛍光タンパク質プラスミドとして pEGFP75, pTagRFP を用い、pReAaLifeact-EGFP, pReAaLifeact-TagRFP を得た。セルロース膜にそれぞれ野生株及び各変異株の胞子懸濁液を接種し、培養した試料をカバーガラスに載せ、上からカバーガラスで閉じて共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて生細胞観察を行った。FITC, EGFP, FM4-64 の蛍光を観察するために 488nm、TagRFP の蛍光を観察するために、559nm の波長を発振するレーザー光を使用した。

4. 研究成果

(1) *RacA* の病原性・菌糸生育に及ぼす影響

RacA の破壊変異株を相同組み換え法により作出し、形態形成について調査を行った。 $\Delta racA$ 変異株は、著しく栄養菌糸の生長速度が減退した。さらに、 $\Delta racA$ 変異株の胞子発芽体に発芽管出現数の増加、菌糸分岐頻度の増加が認められた。 $\Delta racA$ の接種試験を行ったところ、熱処理長十郎ナシ葉への病原性の喪失が認められ、さらに、 $\Delta racA$ を熱処理感受化ナシ葉に有傷接種した場合においても、病斑は全く形成されなかった (図 1)。



(2) 感染時における *NoxA*, *NoxB*, *RacA* の転写量の増加

栄養菌糸、セルロース膜に接種された胞子発芽体、ナシ葉に接種された胞子発芽体における各 *Nox* 及び *RacA* の転写量を定量的 RT-PCR を用いて調査した。その結果、セルロース膜及びナシ葉への感染時に発現が誘導されていることが示された。また、栄養生長時及び感染時に *NoxA* が *NoxB* より多く転写されていること、さらに *NoxA* 及び *NoxB* はセルロース膜への感染時に顕著に発現が誘導されることが示された。また、*RacA* の発現は、セルロース膜及びナシ葉への感染時に発現が誘導されていることが示された。また、*NoxA* 及び *NoxB* とは異なり、*RacA* の

発現量はセルロース膜及びナシ葉への感染時において同程度であった。

(3) *NoxA*, *NoxB*, *RacA* の局在性解析

プロモーター領域を含むそれぞれの遺伝子と蛍光タンパク質を融合させたプラスミド pReAaNxA-mCherry, pReAaNxB-mCherry, pReAaEGFP-RcA を、それぞれ欠変異株 $\Delta noxA$, $\Delta noxB$, $\Delta racA$ のプロトプラスミドに導入した。変異株は欠変異株の表現型を相補したことより、レポーター遺伝子は野生型と同じ機能を有していることが確認された。栄養生長時の菌糸に *NoxA*-mCherry 及び *NoxB*-mCherry の局在は認められなかった (図 2)。セルロース膜上における $\Delta noxA::NoxA$ -mCherry, $\Delta noxB::NoxB$ -mCherry の胞子発芽体では、それぞれの付着器、及びその周囲の細胞に *NoxA*-mCherry, *NoxB*-mCherry の局在が認められた (図 2)。なお、ナシ葉上における胞子発芽体では、 $\Delta noxB::NoxB$ -mCherry の付着器のみに *NoxB*-mCherry の局在が認められた (図 2)。

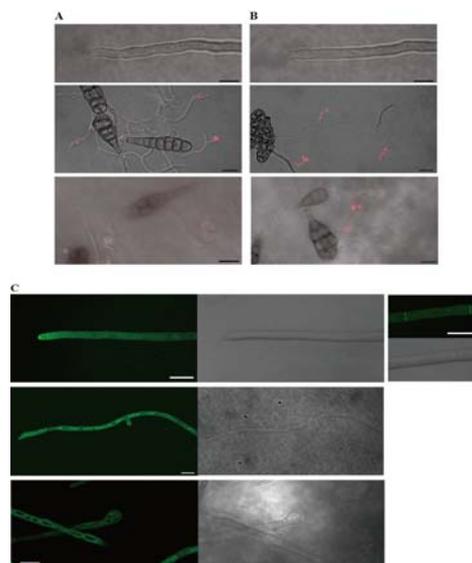


図 2. *NoxA*, *NoxB*, *RacA* レポーター変異株による局在性解析。A: *NoxA* の局在、B: *NoxB* の局在、C: *RacA* の局在 (上段: 栄養菌糸、中段: セルロース膜、下段: ナシ葉)。

EGFP-*RacA* の蛍光は、栄養生長時の $\Delta rac::EGFP$ -*RacA* の菌糸全体に認められるものの、菌糸先端及び隔壁に特に強い局在が認められた (図 2)。セルロース膜上及びナシ葉上における胞子発芽体では、菌糸全体の細胞質及び小胞膜に均一な EGFP-*RacA* の局在が認められ、菌糸先端及び付着器に特異的な局在は認められなかった (図 2)。

(4) ナシ黒斑病菌における侵略力の重要性

これまでの結果より、 $\Delta noxB$ 及び $\Delta noxA$ において宿主特異的毒素の分泌が認められているにも関わらず、20 世紀ナシへの病原性の喪失が示された。そこで、非感受性である長十郎ナシ葉に接種された野生

株の付着器、及び 20 世紀ナシ葉に接種された非病原性株 O-94 の付着器及び貫穿菌糸周辺を透過型電子顕微鏡により比較観察した。それぞれ非親和性であり病斑は形成されないが、それぞれの付着器共に、葉のクチクラ層を突破し、ペクチン層とセルロース層の境界辺りまで貫穿菌糸を伸長させていることが明らかとなった (図 3)。一方で、ナシ葉に接種された $\Delta noxB$ の貫穿菌糸は、クチクラ層とペクチン層の境界辺りで停止していることが示された (図 3)。一方、AK 毒素を添加した非病原性の O-94 株の孢子懸濁液を 20 世紀ナシ葉に接種すると、その付着器は侵入に成功するという報告がある。さらに、野生株及び $\Delta noxA$ を接種された 20 世紀ナシ葉及び長十郎ナシ葉では共にパピラの形成が誘導されることに対し、 $\Delta noxB$ の接種では両ナシ品種においてパピラが形成されないことが示され、病原菌にとって重要な侵略力を生み出すために重要な因子であることが示された (図 3)。

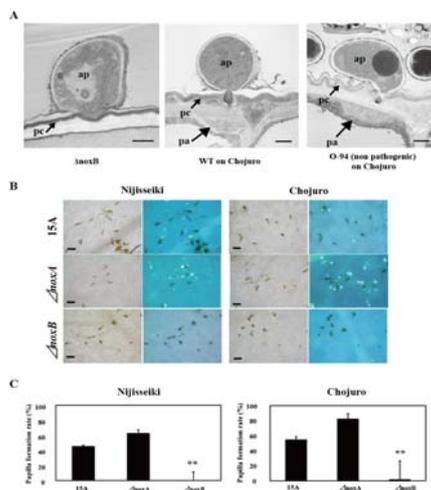


図 3. 侵入力発揮における NoxB の重要性. A: *noxB* 破壊株接種、非感受性植物への野生株接種、毒素非生産菌接種における付着器断面の電子顕微鏡像 (pc: ペクチン層、pa: パピラ)、B, C: 感受性・非感受性植物への各変異株接種におけるパピラ形成写真 (左: 明視野、右: 蛍光視野)、およびパピラ形成頻度。

(5) 光学顕微鏡を用いた付着器における ROS 生成の評価

NBT を用いてスーパーオキシドアニオンの検出を試みたところ、ナシ葉に接種された野生株及び $\Delta noxA$ の侵入菌糸を伴う付着器に青色の強い陽性反応が生じる一方で、 $\Delta noxB$ 及び $\Delta noxA noxB$ の付着器に弱い NBT 陽性反応が生じる傾向が認められた。タマネギ表皮及びセルロース膜に接種された付着器では、野生株と各 Δnox 変異株の間に有意な NBT 染色性の差は認められなかった。

DAB を用いて過酸化水素の検出を試みた結果、ナシ葉に接種された野生株及び $\Delta noxA$ の侵入菌糸を伴う付着器に褐色の陽性反応が生じる一方で、 $\Delta noxB$ 及び $\Delta noxA noxB$

の付着器に陽性反応は認められなかった (図 4)。しかし、意外なことに、タマネギ表皮及びセルロース膜に接種された野生株及び $\Delta noxA$ の付着器は侵入に成功しているものの、それら付着器に DAB の陽性反応は認められなかった (図 4)。

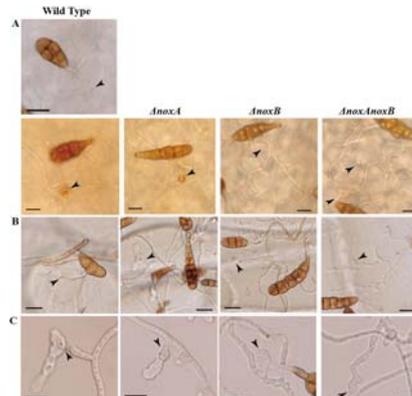


図 4. 各種基質上における活性酸素の生成. A: ナシ葉接種、B: タマネギ接種、C: セルロース膜接種。

(6) 蛍光融合 LifeAct による栄養菌糸及び付着器におけるアクチン配向の可視化

$15A::LifeAct-EGFP$ 及び $\Delta noxB::LifeAct-EGFP$ の菌糸先端では、先端に 1 つのアクチン集合体、また先端側部に複数のアクチン集合体が認められ、大きな違いは認められなかった (図 5)。

一方で、 $\Delta racA::LifeAct-EGFP$ の菌糸先端では、先端に複数のアクチン集合体が認められたが、また先端側部にアクチン集合体は認められなかった (図 5)。

$15A::LifeAct-TagRFP$ の付着器では、アクチンが 1 箇所に集積して観察された (図 5)。一方、 $\Delta noxB::LifeAct-TagRFP$ の付着器では、アクチンは集積せずに散在して観察された (図 5)。

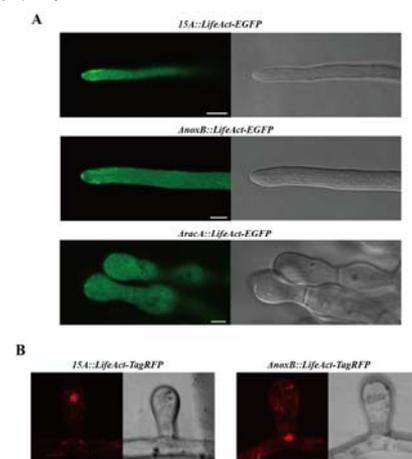


図 5. *noxA*, *noxB*, *racA* 変異株におけるアクチン配向性. A: LifeAct-GFP を用いた局在性解析、B: LifeAct-TagRFP を用いた局在性解析。

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 5件)

- ① Kitagawa, H., Shimoi, S., Inoue, K., Park, P., and **Ikeda, K.** (2014) Durable and broad-spectrum disease protection measure against airborne phytopathogenic fungi by using the detachment action of gelatinolytic bacteria. *Biological Control* (査読有) 71: 1-6. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.12.008
- ② **Ikeda, K.**, Vu, B. V., Kadotani, N., Tanaka, M., Murata, T., Shiina, K., Chuma, I., Tosa, Y., and Nakayashiki H. (2013) Is the fungus *Magnaporthe* losing DNA methylation? *Genetics* (査読有) 195: 845-855. DOI: 10.1534/genetics.113.155978
- ③ Morita Y, Hyon GS, Hosogi N, Miyata, N., Nakayashiki, H., Muranaka, Y., Inada, N., Park, P., and **Ikeda, K.** (2013) Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in the host-specific toxin-producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Molecular Plant Pathology* (査読有) 14: 365-378. DOI: 10.1111/mp.12013

〔学会発表〕(計 23件)

- ① **Ikeda, K.**, Kitagawa, H., Shimoi, S., Inoue, K., Osaki, Y., Nakayashiki, H., and Park, P. (2013) Attachment of airborne pathogens to their host; a potential target for disease control. 10th International Congress of Plant Pathology (Beijing, China, August 28)
- ② Inoue, K., Nakayashiki, H., and **Ikeda, K.** (2013) Autophagy-inducing condition during infection process of *Magnaporthe oryzae*. 10th International Congress of Plant Pathology (Beijing, China, August 26)
- ③ Inoue, K., **Ikeda, K.**, and Nakayashiki, H. (2013) Macroautophagy during appressorium morphogenesis in *Magnaporthe oryzae*. 6th International Rice Blast Conference 2013 (Jeju, Korea, August 22)
- ④ 森田雄一、玄康洙、伊藤里紗、中屋敷均、朴杓允、**池田健一**(2013) ナシ黒斑病菌の RacA の病原性及び胞子発芽に及ぼす影響. 平成 25 年度日本植物病理学会大会 (岐阜大学、岐阜市、3 月 28 日)
- ⑤ **Ikeda, K.**, Morita, Y., Hyon, G.-S., and Park, P. (2012) Appressorium-localized NADPH oxidase is essential for aggressiveness and pathogenicity in *Alternaria alternata*. 2012 KSPP (The Korean Society of Plant Pathology) International Conference (Auditorium, Seoul National University, Seoul, Korea, October 26).
- ⑥ 森田雄一、玄康洙、中屋敷均、稲田のりこ、朴杓允、**池田健一**(2012) ナシ黒斑病菌の付着器局在性 NADPH oxidase B は侵略力発揮に必須である. 平成 24 年度日

本植物病理学会関西西部会(鳥銀文化会館、鳥取市、9 月 28 日)

- ⑦ Morita, Y., Hyon, G.-S., Hosogi, N., Morikawa, K., Kusaka, M., Nakayashiki, H., Inada, N., Tsuge, T., Park, P., and **Ikeda, K.** (2012) Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in host specific toxin producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (Kyoto International Congress Center, Kyoto, July 31).
- ⑧ 北川博子、朴杓允、**池田健一** (2012) ゼラチナーゼ活性を有する微生物の葉面定着性の向上. 平成 24 年度日本植物病理学会大会 (福岡国際会議場、福岡市、3 月 30 日)
- ⑨ Morita Y, Hyon GS, Park P, **Ikeda K.** (2012) Functional analyses of membrane binding NADPH oxidase complex, reactive oxygen species generation machinery, in phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. 日韓植物病理学合同シンポジウム, Fukuoka, March 27.
- ⑩ **池田健一** (2011) 病原菌のアキレス腱をターゲットとした病害防除戦略. 近畿作物・育種研究会公開シンポジウム. (神戸大学、12 月 3 日)
- ⑪ 森田雄一、玄康洙、森川響子、**池田健一**、朴杓允 (2011) ナシ黒斑病菌の感染器官における活性酸素種生成複合体の機能解析. 糸状菌分子生物学コンファレンス(東京大学、11 月 17 日)
- ⑫ 森田雄一、玄康洙、森川響子、**池田健一**、朴杓允 (2011) ナシ黒斑病菌の感染器官における活性酸素種生成複合体の機能解析. 日本植物病理学会関西西部会(サンポートホール高松、10 月 2 日)
- ⑬ 森田雄一、玄康洙、**池田健一**、朴杓允 (2011) ナシ黒斑病菌の付着器における活性酸素種生成の特性解析. 医学生物学電子顕微鏡技術学会(四国大学、5 月 15 日)

〔図書〕(計 1件)

- ① **Ikeda, K.**, Inoue K, Kitagawa H, Meguro H, Shimoi S, Park P (2012) "The role of the extracellular matrix (ECM) in phytopathogenic fungi: a potential target for disease control" in *Plant Pathology INTECH Open Access Publisher* pp. 131-150. DOI: 10.5772/30801

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 健一 (IKEDA Kenichi)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：40437504