

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660092

研究課題名(和文)セルロースを使った雪腐病菌の巧みな生存戦略の解明

研究課題名(英文)Defense mechanism of a snow mold through cellulose production

研究代表者

今井 亮三 (IMAI, Ryozo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域・主席研究員

研究者番号：90291913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：紅色雪腐病菌菌Microdochium nivaleはコムギ等の越冬性穀類に感染する好冷性糸状菌である。本菌は菌体外にセルロースと考えられる多糖を分泌し、植物由来の防御タンパク質から身を守っている。そこで本研究ではM. nivale株からセルロース生合成遺伝子を単離することを試みた。ドラフトゲノムシーケンス情報から、セルロース合成酵素と高いホモロジーを示す遺伝子CSL1、CSL2が見出された。アグロバクテリウムを介した形質転換系を確立後、これらの遺伝子の破壊株を作出した。しかし何れの変異体も、菌体外多糖の分泌したため、CSL以外の遺伝子が生合成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microdochium nivale is a psychrotrophic and cosmopolitan pathogen of grasses, including both cereals and turf grasses. This ascomycete copiously produces extracellular polysaccharide (EPS) in liquid culture, which may provide a physical barrier against plant defensive proteins. The polysaccharide was identified as cellulose in the first report of cellulose synthesis from a member of the true Fungi. Screening of draft genome sequences of M. nivale led to the identification of two cellulose synthase-like genes, CSL1 and CSL2. However, the expression of these genes was not correlated with the synthesis of the EPS. To further explore the relationship between these genes and EPS production, an Agrobacterium-mediated transformation protocol was developed for M. nivale. The CSL1 and CSL2 genes were disrupted in separate lines. In both csl1 and csl2, successful gene silencing was confirmed; however, in both knockout lines EPS was still produced.

研究分野：生物化学

キーワード：雪腐病 真菌 セルロース 抵抗性

1. 研究開始当初の背景

セルロースは -1,4 グルカンの直鎖状多糖であり、植物細胞壁の主要成分である。セルロースの生合成は植物に限られたものではなく、細菌、細胞性粘菌、尾索動物等にも見出されている。一方、酵母カビなどの真菌類は、セルロースを生合成しないと考えられてきたが、最近、雪腐病菌の 1 種である *Microdochium nivale* が菌体外にセルロースを分泌することが示された。雪腐病は積雪下で小麦、牧草等に甚大な被害をもたらす病害で、積雪環境を好む好冷性糸状菌により引き起こされる。我々は、コムギと雪腐病菌の相互作用の研究を行う過程で、興味ある現象を見出した。コムギが低温馴化（低温を認識して耐凍性や耐病性を高める機構）過程で細胞外に分泌する抗菌性タンパク質である TAD1 を精製し、*M. nivale* に処理したところ、抗菌効果が他の菌と比較して著しく低かった。この時、菌体を観察すると、菌体外にセルロースが分泌されており、このセルロース層に TAD1 が吸着されていることが分かった。これらの結果から、植物側が防御目的で分泌する抗菌タンパク質が、病原菌の防御応答を誘導するという新しい植物-病原菌間相互作用のモデルを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、このモデルを検証するため *M. nivale* より真菌類初となるセルロース合成酵素遺伝子を単離し、その機能性を証明する。また、遺伝子破壊により、セルロースの生理機能を精査する。病原菌が示すセルロースの分泌が、植物の攻撃に抵抗する新たな生存手段であることを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養方法

M. nivale FERM-P7298 株は 500mL フラスコを用いて、200 mL のポテトデキストロース培地 (Difco) 中で、200 rpm の条件で培養した。菌株の保存はポテトデキストロース寒天培地のスラントを作製し、4 で行った。

(2) ゲノム DNA の抽出と PCR

ゲノム DNA は 10 で 2 週間培養した菌体から Edward らの方法を改良して行った。最終ペレットは 50 μ L の滅菌水に懸濁し、4、1 時間放置ご沈殿する不溶性多糖を 8000 rpm 5 分の遠心により除去した。上清は -20 で保存し、PCR においては 20 ng/mL の濃度に希釈して用いた。

(3) アグロバクテリウムを用いた形質転換

アグロバクテリウムを用いた形質転換は、eGFP を発現する *M. nivale* 株及び CSL2 遺伝子破壊株の作出に用いた。CSL2 破壊用のベクターの構築は以下の通り行った。CSL2 遺伝子

の 5', 3' 側各 0.5kb 断片をそれぞれ pBI121-eGFP ベクターの *Apa* I, *Kpn* I サイトに挿入し、pBI121- CSL2 を構築した。*M. nivale* の形質転換は Takkenn らの方法⁹⁾を用いた。*M. nivale* の胞子は培養プレート室温、UV 照射下で 2 週間放置して誘導し、2 mL の滅菌水を加え、表面をコンラージ棒で軽く掻き取った。綿のフィルターで菌糸を除去後、顕微鏡下で観察した。胞子の発芽率は単離した胞子を PDA に巻いて計算した。

アグロバクテリア株 LBA4404 及び EHA105 株をカナマイシンを含む MM 培地で 48 時間、28 で培養した。5000 μ g/ml acetosyringon, 50 μ g/ml, kanamycin を含有する IM 培地に OC-0.3 となるように懸濁し、更に 6 時間培養した。形質転換には 100 μ l のアグロバクテリウム懸濁液と等量の *M. nivale* 胞子懸濁液を混ぜ、IM 単培地上に置床した滅菌 Hybond 膜上に滴下した。プレートを 23C で 2 日間静置し、共存培養を行った。共存培養後は 100 μ g/ml cefotaxime, 200 μ g/ml hygromycin を含む選択培地上にメンブランを移し、新たに生じるコロニーを取得した。

(4) 培養菌体並びに菌体外多糖の回収

M. nivale 菌体は 4, 10, 14, 18, 23 の各温度で培養した培養液から回収した。回収時には 200 mL の培養液を 15,000 \times g で 20 分遠心集菌し、外側の菌体外多糖層を洗浄した。菌体外多糖は培養濾液を、滅菌水に対して透析した後、エタノールを 50%濃度まで加えて、沈殿させた。沈殿物は 0.1M NaOH で懸濁し 80 で激しく攪拌した。常温に戻した後中和し、滅菌水に対して透析した。凍結乾燥により多糖固体を回収した。

(5) RNA 抽出および RT-PCR

M. nivale 菌系からの RNA 抽出は Trizol (ライフテクノロジー) を用いて、マニュアルに沿って行われた。cDNA 合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いた。RT-PCR は ExTaq (Takara) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) セルロース生合成酵素候補遺伝子の単離
ゲルフ大学の Tom Hsiang 教授が所有する *M. nivale* のゲノム情報からホヤのセルロース合成酵素とホモロジーの高い 2 つの候補遺伝子を単離し、*CSL1*, *CSL2* と命名した(図 1A)。両遺伝子の発現は菌体外多糖生産や培養温度と相関せず、恒常的に発現していた(図 1B)。

(2) *M. nivale* 形質転換系の開発と変異体取得
候補遺伝子の欠損変異体を取得するため、*M. nivale* における形質転換系の開発を行った。

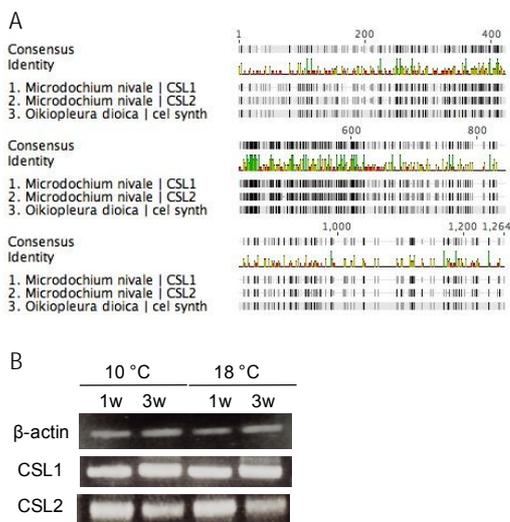


図1. セルロース合成酵素候補遺伝子の構造と発現

最初に、形質転換条件を確立するため GFP を発現するコンストラクトの形質転換を試みた。方法で述べた条件により、形質転換に成功した。遺伝子導入の確認は、ゲノム PCR で行い、導入遺伝子の発現は RT-PCR 法および、GFP の発現を蛍光顕微鏡下で観察することにより行った(図2)。本研究により確立された手法は今後 *M. nivale* における遺伝子導入において、利用されるであろう。

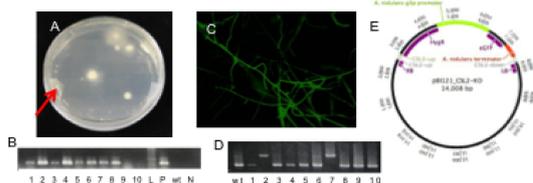


図2. 形質転換体の作出. A) Hygromycin-耐性コロニー. B) gDNA PCR による GFP 遺伝子のゲノム組み込みの検出. Lanes 1-10: hyg-耐性コロニー. L - ladder; P - positive control; N - negative control. C) *M. nivale* の菌糸における GFP の発現. D) CSL2 KO コロニーのスクリーニング. Lanes 2 and 7: CSL2 遺伝子破壊株. E) CSL2 KO plasmid の地図

確立された形質転換手法を用いて遺伝子破壊を試みた。pBI121- CSL2 ベクターを構築し、形質転換を行った。ハイグロマイシン選抜により合計 39 個の耐性コロニーが得ら

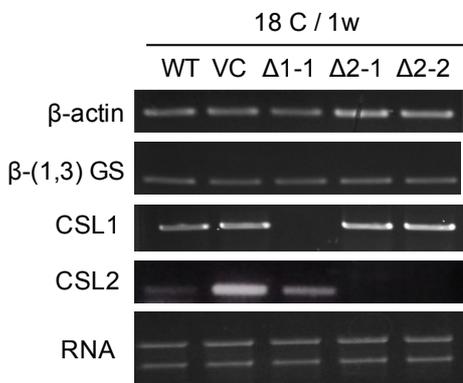


図3. ノックアウト変異体における CSL の発現.

れたが、この内 2 株 (2-1, 2-2) において *CSL2* の破壊が起きていた。CSL1 についても同様にして変異株 (1-1) を得た。各変異体における遺伝子発現を調べたところ、それぞれ *CSL2*, *CSL1* 遺伝子の発現が消失していた (図 3)。

(3) *M. nivale* が生産する多糖の解析
菌体外多糖の生産は、幅広いレンジの温度で観察されたが、特に 14 °C 以下で良好な蓄積を示した (図 4)。多糖についてセルロース染色剤の Congo-red, calcofluor, により染色された。しかしこれらの化合物は -1,3-グルカンも染色するため、結論づけることはできなかった。一方で、アニリンブルー染色は -1,3 に特異的であるが、-1,3 グルカンである curdlan と比べ非常に弱いながら染色された。従って、回収された多糖が 100%セルロースであるという確証は得られなかった。

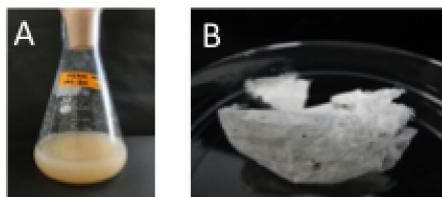


図4. 菌体外多糖の生産(A)と精製された多糖(B)。

低温下及び高温下で培養した *M. nivale* 培養液より回収した菌体外多糖を ¹³C-固体 NMR 解析したところ、NMR チャートを既報の細菌セルロースのチャートと比較した。両者にはピークのずれが生じており、同質のものではないことが分かった。この結果から *M. nivale* の菌体外多糖の糖鎖分岐状態を推定することは困難であった。また、セルロース及び -1,3-glucanase による多糖の分解を調べたところ、標品セルロース及び -1,3-グルカンはこれらの酵素に反応し、分解オリゴ糖が観察されたが、*M. nivale* 菌体外多糖はこれらの酵素により分解されなかった。

(4) *CSL* 破壊株の菌体外多糖の解析
CSL1, *CSL2* 破壊株についてそれぞれ菌体外多糖生産を調べたところ野生株と変化が見られなかった。発現量が多糖蓄積と相関しないことを考慮すると、別の遺伝子が菌体外多糖の生産に関わっている可能性が考えられた。次に、RNAseq 解析により菌体外多糖生産と相関して発現する糖転移酵素遺伝子を検索したところ、PS1, PS3 の 2 つの機能未知遺伝子が同定された。現在これらの変異体を作成している。

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)

[学会発表] (計 1 件)
Linda Jewell, Miho Ono, Tom Hsiang, Ryozo

Imai: Gene disruption of the snow mold fungus *Microdochium nivale* towards identification of a fungal cellulose synthase. Plant and Microbe Adaptations to Cold 2016, May 22-25,2016, Seattle, USA.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今井 亮三 (IMAI, Ryozo)

農研機構・生物機能利用研究部門 遺伝子

利用基盤研究領域・主席研究員

研究者番号：90291913