

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450053

研究課題名(和文)植物の抵抗性システムのスタッキングによるカビ毒産生菌に対する防除戦略の確立

研究課題名(英文) Transgenic stacking to improve plant disease resistance against mycotoxin-producing fungi.

研究代表者

西内 巧(Nishiuchi, Takumi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：20334790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原糸状菌であるムギ類赤かび病菌は、作物に減収だけでなくかび毒汚染による質的な被害をもたらす。本研究では、本菌に罹病性のシロイヌナズナを用いて、植物の抵抗性やかび毒解毒に関わる候補遺伝子の発現を改変させた形質転換体を解析し、抵抗性を顕著に向上させる2遺伝子、かび毒を低減化させる2遺伝子を同定した。これらの遺伝子を効果的に組合せることで、赤かび病による病徴とかび毒蓄積を共に低減化し得る植物の作出が期待された。

研究成果の概要(英文)：Fusarium head blight (FHB) is serious disease leading to significant yield loss and accumulation of trichothecene mycotoxins. To improve disease resistance and mycotoxin detoxification in plants against *F. graminearum*, we generated transgenic stacking in *Arabidopsis* plants. We had identified some defense-related genes that are involved in the disease resistance against *F. graminearum*. Among these genes, we revealed that the *ubq6/6\** double mutant strong disease resistance. The barley *HvGST13* and *HvGR2* genes were specifically upregulated in the barley breeding lines showing lower mycotoxin (DON) accumulation. The *HvGST13ox* and *HvGR2ox* *Arabidopsis* plants were DON-resistant phenotypes compared to wild type. In addition, *HvGST13ox* *Arabidopsis* plants showed weak disease symptoms and low DON accumulation after inoculation of *F. graminearum* conidia. In the future, crossing the *ubq6/6\** mutant with *HvGST13ox* and *HvGR2ox* likely shows low disease symptoms and DON accumulation by *F. graminearum*.

研究分野：植物病理学

キーワード：病害抵抗性 トリコテセン系かび毒 マイコトキシン 赤かび病 スタッキング 解毒

## 1. 研究開始当初の背景

ムギ類赤かび病菌は、コムギやオオムギ等を宿主とする難防除性の植物病原糸状菌であり、また本菌が産生するトリコテセン系かび毒によって、ヒトや家畜に深刻な健康被害を及ぼすことが問題になっている。赤かび病抵抗性品種や変異体において、トリコテセンかび毒の蓄積が期待通りに減少しないことも多く、病徴による抵抗性評価とは区別して、かび毒蓄積の問題に取り組む必要性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、赤かび病による病徴抑制及びかび毒低減化に関わる植物の有用遺伝子を選抜し、さらにそれらを効率的に組合せることで、赤かび病による病徴とかび毒蓄積を顕著に抑制した植物の作出を試みる。

## 3. 研究の方法

赤かび病菌に対する植物の侵入抵抗性及び進展抵抗性、またかび毒蓄積抵抗性の3タイプに分けられる。それぞれの抵抗性に関わると思われる遺伝子を人為的に発現改変した形質転換植物を作製し、各抵抗性の向上に有効な遺伝子を選抜する。さらに、これらの形質転換体を組合せたスタック系統を作製し、赤かび病による病徴とかび毒蓄積を顕著に抑制した植物の作出を試みる。

## 4. 研究成果

植物における赤かび病抵抗性及びかび毒低減化に関わる遺伝子の発現を改変させた形質転換シロイヌナズナを効果的に組合せて、赤かび病菌に対する病徴とかび毒蓄積を共に低減化できる植物の作出を目指した。

(1) 赤かび病侵入及び進展抵抗性を向上させる有用遺伝子の選抜

赤かび病に対する侵入抵抗性に関わる遺伝子として単離した分泌性の抗菌タンパク

質チオニンをコードするシロイヌナズナの *Thi2.4* 遺伝子の過剰発現株、また赤かび病に対する植物の誘導抵抗性に関わる NAD 合成に関わるシロイヌナズナの *NMNAT* 遺伝子の過剰発現株、リボソーム小サブユニットを構成する RPS27a ドメインとユビキチンドメインの両方を有し、赤かび病に対する侵入抵抗性及び進展抵抗性を負に制御することを明らかにしているシロイヌナズナの UBQ6 タンパク質をコードする2つの遺伝子のノックアウト株、これらについて比較解析したところ、*ubq6/6\**の二重変異体が赤かび病菌に対する侵入抵抗性及び進展抵抗性ともに最も強い抵抗性を示した。*ubq6/6\**の二重変異体と *NMNAT* 遺伝子過剰発現株、あるいは *Thi2.4* 遺伝子の過剰発現株とのスタック系統を作出したが、明瞭な抵抗性の向上は見られなかった。*ubq6/6\**二重変異体は機能欠損株であり、ゲノム編集を用いた機能欠損によりムギ類でも抵抗性植物の作出も期待される。

### (2) UBQ6 遺伝子の機能解析

UBQ6 タンパク質は、うどんこ病菌の侵入抵抗性に関わる PEN1 (SYP121) タンパク質と相溶性の高い SYP122 タンパク質と相互作用することが報告されている。そこで、*syp122* 変異体の赤かび病抵抗性について調べたところ、*ubq6/6\**二重変異体に比べると顕著ではないものの、野生型に比べて抵抗性が向上している結果が得られた。*ubq6/6\**二重変異体と *syp122* 変異体の交配による多重変異体の作出を試みている。

*ubq6/6\**二重変異体と野生株におけるユビキチンタンパク質の発現パターンについて調べた。未処理時に発現パターンの異なるタンパク質は少なかったが、赤かび病菌接種時には、変異体と野生株で差異を示すタンパク質が多数みられた。これらのユビキチンタンパク質の同定を行ったが、抵抗性への関与が示唆されるタンパク質の同定には至らな

った。現在、実験系の再検討を進めている。

### (3) かび毒低減化遺伝子の選抜

赤かび病が産生するトリコテセン系かび毒を低減化する候補遺伝子として、オオムギの低かび毒蓄積品種で高発現していた、かび毒とグルタチオンのコンジュゲート産生に関わると期待される *HvGST13* 遺伝子、また還元型グルタチオンの産生に関わる *HvGR2* 遺伝子について、シロイヌナズナにおける過剰発現株を作製した。*HvGST13* 過剰発現株及び *HvGR2* 過剰発現株は、共に複数系統で野生型に比べて、かび毒(デオキシニバレノール)耐性を示すことを明らかにした。実際に、赤かび病菌接種すると、これらの過剰発現株では野生型に比べてかび毒が減少していた。現在、*HvGST13* 過剰発現株及び *HvGR2* 過剰発現株を交配させたスタック系統の作出を行っている。

*HvGST13* タンパク質のアミノ酸配列をオオムギの低かび毒蓄積品種と高蓄積品種と比較したところ、アミノ酸置換を伴う一塩基置換が触媒ドメイン内に検出された。このアミノ酸置換が酵素活性に与える影響について、大腸菌で発現させたタンパク質を調整し、生化学的な解析を進めている。

以上の結果から、*ubq6/6\**の二重変異体と *HvGST13* 過剰発現株、あるいは *HvGR2* 過剰発現株の交配を試み、これらの解析を進めることで赤かび病による病徴とかび毒蓄積を共に低減化し得る植物の作出が期待される。

### 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11件)

Kodama S, Ishizuka J, Miyashita I, Ishii T, Nishiuchi T, Miyoshi H, Kubo Y. (2017) The morphogenesis-related NDR kinase pathway of *Colletotrichum orbiculare* is

required for translating plant surface signals into infection-related morphogenesis and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 13(2):e1006189. doi: 10.1371/journal.ppat. (査読有)

Fukunaga S, Sogame M, Hata M, Singkaravanit-Ogawa S, Piślewska-Bednarek M, Onozawa-Komori Ma, Nishiuchi T, Hiruma K, Saitoh H, Terauchi R, Kitakura S, Inoue Y, Bednarek P, Schulze-Lefert P, Takano Y. (2017) Dysfunction of Arabidopsis MACPF domain protein activates programmed cell death via tryptophan metabolism in MAMP-triggered immunity. *The Plant J* 89:381-393. doi:10.1111/tpj.13391. (査読有)

Ezaki B, Higashi A, Nanba N, Nishiuchi T. (2016) An S-adenosyl Methionine Synthetase (SAMS) Gene from *Andropogon virginicus* L. Confers Aluminum Stress Tolerance and Facilitates Epigenetic Gene Regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2016, 8:1627.

DOI:0.3389/fpls.2016.01627 (査読有)

Maeda K, Nakajima Y, Tanahashi Y, Kosaki T, Kitou Y, Kanamaru K, Kobayashi T, Nishiuchi T, Kimura M. (2016) Characterization of the acivicin effects on trichothecene production by *Fusarium graminearum* species complex. *J Gen Appl Microbiol.* 62: 272-276. DOI:10.2323/jgam.2016.04.002 (査読有)

Maeda K, Tanaka A, Sugiura R, Koshino H, Tokai T, Sato M, Nakajima Y, Tanahashi Y, Kanamaru K, Kobayashi T, Nishiuchi T, Fujimura M, Takahashi-Ando N, Kimura M. (2016) Hydroxylations of trichothecene rings in the biosynthesis of *Fusarium* trichothecenes: evolution of alternative

pathways in the nivalenol chemotype. *Environ Microbiol.* 18:3798-3811. doi: 10.1111/1462-2920. (査読有)

Harata K, Nishiuchi T, Kubo Y. (2016) *Colletotrichum orbiculare* WHI2, a Yeast Stress-Response Regulator Homolog, Controls the Biotrophic Stage of Hemibiotrophic Infection Through TOR Signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 29:468-483 .doi: 10.1094/MPMI-02-16-0030-R.(査読有)

Kitou, Y., Nakajima, Y., Maeda, K., Jin, Q., Nishiuchi, T., Kanamaru, K., Kobayashi, T., and Kimura, M. (2016) Re-examination of genetic and nutritional factors related to trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Biosci. Biotech. and Biochem.* 28:1-4. doi: 10.1080/09168451.2015.1088374. (査読有)

Sato, M., Nishiuchi, T. and Sakamoto, T. Responses to intermittent exposure to green light during the dark period in *Arabidopsis thaliana* and possible involvement of cryptochrome 2. (2015) *Plant Biotech.* 3: 263-266. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0729a (査読有)

Nakajima, Y., Koseki, N., Sugiura, R., Tominaga, N., Maeda, K., Tokai, T., Izawa, M., Kanamaru, K., Kamakura, T., Kobayashi, T., Nishiuchi, T., Yoshida, M., and Kimura, M. (2015) Effect of disrupting the trichothecene efflux pump encoded by *FgTri12* in the nivalenol chemotype of *Fusarium graminearum* *The Journal of General and Applied Microbiology* 61:93-96. doi: 10.2323/jgam.61.93.10.2323/jgam.61.93. (査読有)

西内 巧, 木村 真, 佐藤 和広 (2015) 「ムギ類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の植物における作用機構と低減化へのアプローチ」 *JSM Mycotoxins* 65: 143 - 147. doi:10.2520/myco.65.143 (査読有)

Maeda, K., Nakajima, Y., Motoyama, T., Kitou, Y., Kosaki, T., Saito, T., Nishiuchi, T., Kanamaru, K., Osada, H., Kobayashi, T. and Kimura, M. (2014) Effects of acivicin on growth, mycotoxin production and virulence of phytopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiol.* 59:377-383. doi: 10.1111/lam.12289. (査読有)

〔学会発表〕(計10件)

西内巧、澤田有司、平井優美、中島裕、佐藤和広、木村真 「植物由来の代謝物を用いた赤かび病防除及びかび毒低減化技術の開発」 日本農薬学会第42回大会、2017年3月6~8日、愛媛大学(愛媛県松山市)

深田史美、西内巧、久保康之 「炭疽病菌およびいもち病菌において RabGAP Bub2 は細胞周期および隔壁形成を制御し植物感染に關与する」 平成28年度植物病理学会関西西部会、2016年9月29~30日、静岡コンベンションアーツセンター(静岡県静岡市)

中嶋佑一、塩原拓也、前田一行、棚橋義和、金丸京子、小林哲夫、西内巧、木村真 「かび毒産生抑制技術の開発を目指したトリコテセン生合成制御機構の解析」 日本マイコトキシン学会第79回学術講演会、2016年7月29日、文部科学省研究交流センター(茨城県つくば市)  
小玉紗代、西内巧、久保康之 「ウリ類炭疽病菌における MOR シグナル伝達経路は孢子表面エステラーゼにより生成されたクチンモノマー認識を介した付着器形

成に關与する」平成 28 年度植物病理学会大会、2016 年 3 月 21～23 日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市) 前田一行、越野広雪、田中彰、杉浦涼介、東海武史、佐藤真之、棚橋和義、中嶋佑一、金丸京子、小林哲夫、西内 巧、藤村 真、安藤直子、木村 真 「ニバレノール生合成の分子遺伝学 - 生合成酵素および alternative hydroxylase によるトリコテセン骨格の水酸化」日本マイコトキシン学会第 77 回学術講演会、2015 年 9 月 11 日、庄内産業振興センターマリカ市民ホール(山形県鶴岡市) 三輪晃敬、澤田有司、平井優美、佐藤和広、西内巧 「NAD 及び関連代謝物による植物の病害抵抗性誘導の解析」平成 26 年度植物生理学会、2015 年 3 月 16～18 日、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区) 三輪晃敬、澤田有司、平井優美、佐藤和広、西内巧 「ニコチンアミドモノヌクレオチドによる植物の病害抵抗性誘導の解析」平成 26 年度植物病理学会関西西部会、2014 年 9 月 27～28 日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市) 三輪晃敬、西村浩二、佐藤雅彦、加藤智朗、古賀博則、木村真、佐藤和広、西内巧 「赤かび病抵抗性及びかび毒感受性に関わる *UBQ/RPS27a* 遺伝子の機能解析」平成 26 年度植物病理学会関西西部会、2014 年 9 月 27～28 日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市) 三輪晃敬、澤田有司、平井優美、佐藤和広、西内巧 「ニコチンアミドモノヌクレオチドによる植物の病害抵抗性誘導の解析」平成 26 年度植物病理学会大会、2014 年 6 月 2～4 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 佐々木亮輔、三輪晃敬、加藤智朗、古賀博則、木村真、佐藤和広、西内巧 「赤

かび病抵抗性及びかび毒感受性に関わる *UBQ/RPS27a* 遺伝子の機能解析」平成 26 年度植物病理学会大会、2014 年 6 月 2～4 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

Asano T, Nishiuchi T. (2014) Quantitative phosphoproteomic analysis using iTRAQ method. *Methods Mol Biol.* 1171:251-258

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：赤かび病菌かび毒産生抑制剤  
発明者：木村真、前田一行、中嶋裕一、西内巧、三輪晃敬  
権利者：国立大学法人名古屋大学、金沢大学、  
種類：特願  
番号：2015-226384  
出願年月日：2015 年 11 月 19 日  
国内外の別：国内

名称：赤かび病抵抗性植物、その作製方法及びその利用  
発明者：西内巧、三輪晃敬、佐藤和広  
権利者：国立大学法人金沢大学、岡山大学  
種類：特願  
番号：2014-180661  
出願年月日：2014 年 9 月 4 日  
国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：赤かび病抵抗性植物の作製方法およびその利用  
発明者：西内巧、加藤智朗、浅野智哉  
権利者：国立大学法人金沢大学  
種類：特願  
番号：特許第 5794610 号  
出願年月日：2010 年 2 月 1 日  
取得年月日：2015 年 8 月 21 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
[https://www.researchgate.net/profile/Takumi\\_Nishiuchi](https://www.researchgate.net/profile/Takumi_Nishiuchi)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西内 巧 (NISHIUCHI, Takumi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号：20334790

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )