

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07669

研究課題名(和文)植物病原菌類の病原性発現におけるホメオボックス転写因子の役割および進化

研究課題名(英文) Role and evolution of homeobox transcription factor in pathogenicity of plant pathogenic fungi

研究代表者

鈴木 一実 (Suzuki, Kazumi)

滋賀県立大学・環境科学部・教授

研究者番号：90390880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウリ類炭疽病菌のゲノム情報を解析したところ、本菌は10個のホメオボックス遺伝子を有することが明らかとなった。これら10個のホメオボックス遺伝子すべてについて、相同性組換えによる遺伝子破壊株の作出と表現型の解析を実施した。5種類のホメオボックス遺伝子はそれぞれ本菌の植物への感染過程で異なる機能を有していること、いずれも病原性関連遺伝子として本菌の病原性発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、他の植物病原菌でも同様な機能が認められることから、これらの遺伝子は進化的にもよく保存された遺伝子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、これまで十分に明らかにされていなかった、植物病原菌の病原性発現におけるホメオボックス転写因子の機能や役割および進化が明らかとなった。今後の研究の進展により、ホメオボックス転写因子を含む細胞内シグナル伝達機構の解明が期待される。また、社会的意義としては、これらの成果は農業上重要な植物病害における新しい防除方法や新しい殺菌剤の開発につながる有益な知見を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genome analysis revealed that the plant pathogenic fungus, *Colletotrichum orbiculare*, causal agent of cucumber anthracnose, has 10 homeobox genes. All of ten genes were disrupted using homologous recombination and the function of each homeobox gene was estimated through phenotypic analysis. Results show that 5 homeobox genes are involved in different morphogenetic processes during plant infection and that these genes play important roles in pathogenicity of this fungus as pathogenicity related genes. Furthermore, these genes are evolutionally conserved since similar function was observed in homologues of other plant pathogenic fungi.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 ホメオボックス遺伝子 病原性発現 付着器形成 付着器侵入 遺伝子破壊 バイオトロフィー ネクロトロフィー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物病原菌類は植物病害の病原体の約 8 割を占めるといわれている。農業現場での菌類による植物病害の防除には多くの農業用殺菌剤が処理されている。有効な薬剤も知られているが、薬剤の連用により薬剤に対する感受性の低下した薬剤耐性菌が出現し、薬剤の防除効果が十分に発揮されない事例も報告されている。また、薬剤の安全性、自然生態系への影響を考慮して、薬剤のみに頼らず、病原菌の感染・発病機構を逆手にとって、効率よく植物病害を防除する手段やシステムの開発も強く求められている。

(2) 植物病原菌類の病原性発現機構(病原菌はどのようにして宿主植物に感染して発病を引き起こすのか)の解明は植物病害における新しい防除法や環境負荷のより小さい新規殺菌剤の開発につながると考えられる。植物病原菌類の病原性発現機構の解析には、病原菌がもつ病原性発現に関与している「病原性関連遺伝子」の単離および同定が重要である。病原性発現に関与している新規な病原性関連遺伝子が解明できれば、その遺伝子産物の機能を阻害する化合物の選抜といった新しい農業用殺菌剤の創生につながる基礎的な実験系を構築することが可能となる。

(3) これまでに、AtMT (*Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation) 法を用いたウリ類炭疽病菌 104-T 株のランダム突然変異誘導試験を行い、Path-1 ~ Path-14 の計 14 菌株の病原性欠損変異株を選抜した。このうち Path-9 株では病原性欠損の原因遺伝子としてホメオボックスドメインを有する遺伝子 (*CoHox1*) が破壊されていることを明らかとてきた。

(4) ウリ類炭疽病菌は 10 個のホメオボックス遺伝子を有することがゲノム解析から明らかとなった。さらに、10 個のうち 2 個のホメオボックス遺伝子については遺伝子破壊株を作出し、表現型の解析を実施した。相同性組換えによる *CoHox1* 遺伝子と *CoHox3* 遺伝子破壊株を作出し、表現型を解析したところ、*CoHox1* 遺伝子は宿主植物内での侵入菌糸の形態分化に、*CoHox3* 遺伝子は付着器の形態分化に関与していることが明らかとなった。また、*CoHox10* 遺伝子はすでに先行研究で付着器貫入に関与していることが報告されている *CST1* (*Ste12*) 遺伝子であることが判明した。機能が未解明の残りの遺伝子についても、一部遺伝子破壊ベクターの構築と遺伝子破壊株の作出を実施した。

### 2. 研究の目的

(1) ホメオボックス遺伝子は、ショウジョウバエにおいて触角や足などの大規模な形態形成に関与することが知られている、遺伝子発現の重要な制御因子である。ホメオボックス転写因子は動物に限らず、植物や菌類でも保持されており、発生の調節を行い、DNA に結合して遺伝子の転写を制御する働きを持つ。植物病原菌におけるホメオボックス遺伝子の機能解析に関する研究例は少なく、病原性発現におけるホメオボックス転写因子の役割あるいは機能分化、さらに植物病原菌におけるホメオボックス転写因子の進化については不明な点が多い。

(2) これまでにウリ類炭疽病菌が 10 個のホメオボックス遺伝子を有すること、そのうち 3 個のホメオボックス遺伝子が感染過程でそれぞれ異なる機能を果たしていることを明らかとした。本研究では機能が未解明の他の 7 個のホメオボックス遺伝子の病原性および形態分化における機能を詳細に解析した。さらに、ウリ類炭疽病菌と他の植物病原菌類におけるホメオボックス遺伝子の機能を比較することにより、植物病原菌類の有するホメオボックス転写因子の病原性発現における役割や進化について考察を加えた。

### 3. 研究の方法

(1) ウリ類炭疽病菌のゲノム情報から得られた他の 7 種類のホメオボックス遺伝子の遺伝子情報からそれぞれの遺伝子破壊ベクターを構築し、相同性組換えによる遺伝子破壊株を作出した。得られたホメオボックス遺伝子破壊株の表現型(培地上での菌そう生育および分生孢子形成、分生孢子的形態分化、宿主キュウリ葉に対する病原性、宿主植物上での形態分化)を詳細に解析することにより、各ホメオボックス遺伝子の病原性発現における機能を網羅的に解析した。

(2) 植物病原菌におけるホメオボックス転写因子の機能分化や進化および病原性における役割を総合的に明らかにするために、トウモロコシごま葉枯病菌、各種植物灰色かび病菌およびイネいもち病菌などの農業上重要な植物病原菌におけるホメオボックス遺伝子の機能を解析した。トウモロコシごま葉枯病菌、灰色かび病菌およびイネいもち病菌がそれぞれ 10 個、9 個、8 個のホメオボックス遺伝子を有することが明らかとなった。さらに、それらの系統関係について系統樹を作成し、機能の類似性について比較した。

### 4. 研究成果

(1) ウリ類炭疽病菌の有する 10 個のホメオボックス遺伝子のすべてについて、遺伝子破壊株が作出でき、表現型の解析によりそれらの機能が推定できた。*CoHox2* 遺伝子破壊株を作出し、表現型を解析したところ、*CoHox2* 遺伝子破壊株では分生孢子形成数が著しく減少し、逆に剛毛形成は増加した。このことから、*CoHox2* 遺伝子は分生孢子形成を正に、剛毛形成を負に制御し

ていることが明らかとなった。また、剛毛が培養初期に分生胞子を形成する機能と培養後期に菌糸を伸長させる機能を持つことが考えられた。

(2) *CoHox4* 遺伝子破壊株を作出し、表現型を解析したところ、*CoHox4* 遺伝子破壊株は顕著な菌糸生育能力の低下、分生胞子形成数の低下、分生胞子の長径の増大、付着器形成の異常および病原性の著しい低下を引き起こした。したがって、*CoHox4* 遺伝子が栄養菌糸生育、分生胞子の形態および付着器の形成のような多様な形態分化を制御し、完全な病原性に必要であることが示唆された。一方、*CoHox5* 遺伝子、*CoHox6* 遺伝子、*CoHox7* 遺伝子、*CoHox8* 遺伝子および *CoHox9* 遺伝子破壊株では野生株と比較して感染過程における差異は認められなかった。

(3) これらのことから、ウリ類炭疽病菌が有する 10 個のホメオボックス遺伝子のうち、少なくとも 5 種類の遺伝子 (*CoHox1*, *CoHox2*, *CoHox3*, *CoHox4* および *CST1* 遺伝子) はそれぞれ感染過程で異なる機能を有していること、いずれも病原性関連遺伝子として本菌の病原性発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、感染過程への関与が認められなかった 5 個の遺伝子 (*CoHox5* 遺伝子、*CoHox6* 遺伝子、*CoHox7* 遺伝子、*CoHox8* 遺伝子および *CoHox9* 遺伝子) については環境ストレスに対する耐性付与などへの関与が推定される。

(4) 農業上重要な植物病原菌であるトウモロコシごま葉枯病菌、各種植物の灰色かび病菌およびイネいもち病菌がそれぞれ 10 個、9 個および 8 個のホメオボックス遺伝子を有していることがゲノム解析から明らかとなった。また、*CoHox2* 遺伝子、*CoHox3* 遺伝子および *CoHox4* 遺伝子のイネいもち病菌あるいは灰色かび病菌のホモログ遺伝子の破壊株がウリ類炭疽病菌のそれぞれの遺伝子破壊株と同様な表現型を示したことから、*CoHox2* 遺伝子、*CoHox3* 遺伝子および *CoHox4* 遺伝子が植物病原菌において進化的によく保存された遺伝子であることが示唆された。

(5) 本研究の成果として、これまで十分に明らかにされていなかった、植物病原菌におけるホメオボックス転写因子の機能や病原性発現における役割ならびに進化が明らかとされた。さらに、今後の研究の進展により、ホメオボックス転写因子を含む細胞内シグナル伝達機構が解明されることが期待される。これらの新しい知見は植物病害における新しい防除法や殺菌剤の開発を進める上で重要で有益な知見を提供するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokoyama Aya, Izumitsu Kosuke, Sumita Takuya, Tanaka Chihiro, Irie Toshikazu, Suzuki Kazumi	4. 巻 59
2. 論文標題 Homeobox transcription factor CoHox3 is essential for appressorium formation in the plant pathogenic fungus <i>Colletotrichum orbiculare</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 353 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.02.001">https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.02.001</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Aya, Izumitsu Kosuke, Irie Toshikazu, Suzuki Kazumi	4. 巻 60
2. 論文標題 The homeobox transcription factor CoHox1 is required for the morphogenesis of infection hyphae in host plants and pathogenicity in <i>Colletotrichum orbiculare</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mycoscience	6. 最初と最後の頁 110 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.11.001">https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.11.001</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小幡善也, 横山 綾, 泉津弘佑, 入江俊一, 鈴木一実	4. 巻 85
2. 論文標題 ウリ類炭疽病菌においてホメオボックス転写制御因子CoHox2は分生胞子形成および剛毛形成を制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本植物病理学会報	6. 最初と最後の頁 334-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3186/jjphytopath.85.334">https://doi.org/10.3186/jjphytopath.85.334</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小幡善也, 横山 綾, 泉津弘佑, 入江俊一, 鈴木一実	4. 巻 86
2. 論文標題 ウリ類炭疽病菌においてホメオボックス転写制御因子CoHox4は菌糸生育, 分生胞子の形態および付着器形成を制御する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本植物病理学会報	6. 最初と最後の頁 85-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3186/jjphytopath.86.85">https://doi.org/10.3186/jjphytopath.86.85</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小幡善也, 横山 綾, 泉津弘佑, 入江俊一, 鈴木一実
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌のホメオボックス転写因子CoHox4は栄養菌糸生育, 分生胞子の形態, 付着器形成および病原性に関与する
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小幡善也, 横山 綾, 泉津弘佑, 入江俊一, 鈴木一実
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌のホメオボックス転写因子CoHox4は多様な形態分化および病原性に関与する
3. 学会等名 第17回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	泉津 弘佑  (Izumitsu Kosuke)  (20579263)	滋賀県立大学・環境科学部・講師    (24201)	
研究協力者	横山 綾  (Yokoyama Aya)		
研究協力者	小幡 善也  (Obata Yoshiya)		