

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19614010

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の光環境応答：分子基盤の解明と寄生戦略の追求

研究課題名（英文）Photoresponses of the 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：イネごま葉枯病菌を用いて、近紫外線及び青色光照射によって発現が増加する50以上の新規光環境応答遺伝子を明らかにした。そして、光受容体の候補となりうるオプシン様遺伝子、及び、青色光受容体（BLR1）の制御を受ける遺伝子等を見いだした。イネごま葉枯病菌の分生孢子形成は太陽光の照射条件に依存しており、宿主植物への感染に対する寄生戦略が推察された。また、紫外線防御に関連するメラニンの植物病原糸状菌における役割を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：イネごま葉枯病菌，光環境応答，近紫外線，青色光，植物病原糸状菌，メラニン，光誘導性遺伝子，光受容体

## 1. 研究開始当初の背景

植物病原微生物は、穀類・野菜類・果樹類といった作物をはじめ、牧草や樹木あるいは草花といった植物に被害を与え、その概算減収量は10-20%にも及ぶ。植物病原微生物の約80%は植物病原糸状菌（カビ）によって引き起こされ、その多くが孢子を形成する。孢子の多くは風によって風媒伝搬し、孢子が宿主植物に付着した後、一定の条件下で発芽・侵入し、菌糸が植物内で増殖した結果、病徴が現れる。これまでの研究で、多くの植物病

原糸状菌の孢子形成が、紫外線や青色光の光（電磁波）によって調節されることが明らかになっている。

このことから、植物病原糸状菌の多くは、宿主植物へ効率的に感染するため、光環境を情報として利用し、孢子形成の量やタイミングを調節していると考えられている。しかしながら、植物病原糸状菌の光受容体をはじめとした光環境応答の分子基盤については、これまで明らかにされておらず、また、その生態学的意義についても説明されていないの

が現状である。植物病原糸状菌の光環境応答は、植物病原糸状菌の生存・寄生戦略に不可欠な機構であると考えられることから、植物病原糸状菌の光環境応答の分子基盤を解明し、その寄生戦略を追求することは、新しい植物保護技術の開発につながるものと期待されている。

我々は、イネの植物病原糸状菌であるイネごま葉枯病菌を用いて、近紫外線（波長300-400nm）照射が、紫外線の防御に関わる黒色色素メラニンの合成系遺伝子の発現を特異的に増加させることを明らかにした。また、紫外線によって生じたDNA傷害の修復に関わる光回復酵素遺伝子の発現も近紫外線照射によって増加することを明らかにした。一方で、イネごま葉枯病菌の宿主であるイネは、日本各地で栽培されており、今後、生態学的な研究にも利用できると考えている。このように、イネごま葉枯病菌は、植物病原糸状菌における光環境応答の分子基盤を解明し、寄生戦略を追求するうえで、良い研究材料になることが期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物病原糸状菌の光環境応答の分子基盤を解明するため、植物病原糸状菌であるイネごま葉枯病菌を用いて、特に近紫外線によって発現量が増加する光環境応答関連遺伝子の網羅的な同定及びカタログ化を行なうことを目的とした。また、植物病原糸状菌の生存戦略・寄生戦略からみた光環境応答の生態学的意義を解明するため、野外におけるイネごま葉枯病菌の孢子形成や飛散のモニタリングの実験系を確立するとともに、紫外線防御関連遺伝子の病原性・孢子形成における役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 光誘導性遺伝子のカタログ化

#### ①差次的発現遺伝子ライブラリの構築

暗黒下及び近紫外線または青色光を1時間照射したイネごま葉枯病菌のコロニーから、total RNAを抽出した。PCR-Select Subtraction Kitを用いて、Suppression Subtractive Hybridizationを行ない、遺伝子断片をpT7Blue T-Vectorにサブクローニングし、差次的遺伝子発現ライブラリを構築した。

#### ②EST解析

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerを用いて、それぞれのクローンに含まれる遺伝

子のシーケンスを行なった。得られた塩基配列を用いて、日本DNAデータベースのWebサイトで相同性解析を行ない、光誘導性遺伝子のカタログ化を行なった。

#### ③差次的発現遺伝子の発現解析

暗黒下または各種光照射した菌体からtotal RNAを抽出し、1本鎖cDNAを合成した。それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作成し、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa)を用いて、Real-Time PCRによる発現定量解析を行なった。

### (2) 青色光受容体による遺伝子発現制御

イネごま葉枯病菌の青色光受容体遺伝子 (*BLRI*) を相同置換することにより、青色光受容体遺伝子破壊株を作成した。

### (3) メラニン合成遺伝子の転写因子の解析

イネごま葉枯病菌から、PCR-based クローニングにより、メラニン合成系遺伝子の転写因子をコードする遺伝子 (*BMRI*) をクローニングした。相同置換による *BMRI* 遺伝子破壊、及び、*BMRI* 過剰発現により、*BMRI* 遺伝子の機能を解析した。

### (4) オプシン様遺伝子の発現解析

2つのオプシン様遺伝子の全長のクローニングを行なうとともに、推定アミノ酸配列を用いて、他のオプシンとの比較を行なった。また、Real-Time PCRを用いて、様々な光照射条件におけるオプシン様遺伝子の発現解析を行なった。

### (5) 野外における孢子形成調査

暗黒下で4日間培養したイネごま葉枯病菌のコロニーに、太陽光を一定時間照射後、暗黒下で1日培養し、孢子形成数を調査した。太陽光のスペクトル及び光強度の測定は、スペクトロラジオメーターを用いて行なった。

### (6) 病害拡大のモニタリング実験系の確立

孢子飛散による病害の広がりを小規模でモニタリングするための実験系を確立した。50cm四方のシードリングトレーにイネ種子を播種し、3-5葉期まで育てた。そこに、病斑を形成したイネ苗をおき、一定期間ごとに病斑の広がりを調査した。

### (7) 紫外線防御関連遺伝子の機能解析

野生株及びメラニン合成系遺伝子の転写因子をコードする *BMRI* 遺伝子の破壊株の分生孢子をイネに噴霧接種し、病斑形成野程度を野生株と比較した。また、形成された病斑における孢子形成状態を実体顕微鏡で調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 光誘導性遺伝子のカタログ化

イネごま葉枯病菌の光環境応答の分子基盤を明らかにするため、Suppression Subtractive Hybridization (SSH) 法による光誘導性遺伝子の網羅的な探索を行なった。1000以上のクローンのEST解析を行ない、日本DNAデータバンクのデータベースを利用して、相同性解析を行なった(表1)。また、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作成し、近紫外線照射による発現量の定量解析を行なった。その結果、近紫外線によって発現が10~100倍に増加する50以上の新規光誘導性遺伝子を明らかにした。これら光誘導性遺伝子のほとんどは、これまでに、近紫外線照射による発現量の増加が国内外で報告されておらず、イネごま葉枯病菌の光環境応答の分子基盤を解明する上で、これら光誘導性遺伝子は有効な解析対象になるものと考えられた。

表1 近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子の推定アミノ酸配列ともっとも相同性の高かったタンパク質(一部)

Clone BLAST match	Clone BLAST match
N124 Zygote-specific class V copy B gene protein	N448 O-methyltransferase
N134 Cytochrome P450 CYP2 subfamily	N489 3-dehydroquinate synthase
N249 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase	N506 Hypothetical protein
N261 Glycoxy transferase family protein	N512 Cell division protein FtsW
N269 Conidiation-specific protein-like protein	N544 Opain-like protein
N270 Predicted protein	N572 Opain-like protein
N273 Phenol 2-monooxygenase	B041 ABC multidrug transporter
N310 C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> transcription factor	B064 Scytalone dehydratase
N318 Hypothetical protein	B154 Hypothetical protein
N320 Hypothetical protein	B177 Acetyl-CoA carboxylase
N324 Hypothetical protein	B193 Phytylene dehydrogenase
N337 Cryptochrome DASH	B249 Predicted protein
N338 Fasciclin domain family	G038 Hypothetical protein
N341 Dehydrogenases with different specificities	G051 Similarity to hypothetical methyltransferase adpI
N360 Pentapeptide repeat protein	G070 Hypothetical protein
N371 Predicted protein	G079 Oxidoreductase
N408 StcQ-like protein	G090 NACHT domain protein
N420 MFS aflatoxin efflux pump	G134 Deoxydipyrromethane photolase
N429 Hypothetical protein	G136 Peptidyl-cis-trans isomerase H
N441 Hypothetical protein	

##### (2) 青色光受容体による遺伝子発現制御

青色光受容体遺伝子 (*BLR1*) 破壊株を用いて、光誘導性遺伝子の発現を調査した結果、29遺伝子で、近紫外線照射による発現増加が認められなかったことから、これら29遺伝子は青色光受容体BLR1を介して制御されることが示唆された。これら遺伝子は、青色光による光環境応答の分子基盤を解明するうえで、ひとつの指標になることが示唆された。

##### (3) メラニン合成遺伝子の転写因子の解析

これまでに、イネごま葉枯病菌では、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が明らかになっている。はじめに、メラニン合成系遺伝子の転写制御因子をコードする遺伝子 (*BMRI*) をクローニングした。*BMRI*遺伝子破壊株ではメラニン合成系遺伝子の発現がまったく認められず、メラニン合成がおこらないこと、また、*BMRI*遺伝子過剰発現株では、野生株よりもメラニン合成系遺伝子の発現が増加し、野生株と比較してコロニーの色がより黒色になることを明らかにした(図1)。さらに、*BMRI*遺伝子の発現もまた、近紫外線照射により増加することが示された。以上の結果から、メラニン合成

系遺伝子は、近紫外線による光環境応答の分子基盤を解明するうえで、ひとつの指標になることが示唆された。[雑誌論文①]



図1 PDA培地上における菌糸生育  
左: *BMRI* 遺伝子破壊株  
右: *BMRI* 遺伝子過剰発現株  
中央: 野生株

##### (4) オプシン様遺伝子の発現解析

2つのオプシン様遺伝子の推定アミノ酸配列には、これまでに報告されているオプシタンパク質に認められる膜7回貫通領域及びレチナル結合部位のリジン残基があることが確認された。次に、Real-Time PCRを用いた発現解析を行なった。*OPS1*遺伝子は、暗黒下での発現量は低かったが、近紫外線を照射すると、発現量が100倍以上増加した(図2)。一方、*OPS2*遺伝子は、暗黒下でも高いレベルで恒常的に発現していたが、近紫外線を照射すると、発現量が10倍以上増加した(図2)。これら*OPS1*及び*OPS2*遺伝子の近紫外線照射による発現量の増加は、青色光受容体遺伝子破壊株で認められなくなったことから、青色光受容体が*OPS1*及び*OPS2*遺伝子の発現制御に深く関与することが示唆された。[雑誌論文②]。今後、イネごま葉枯病菌における2つのオプシン様遺伝子の機能解析を行っていく予定である。

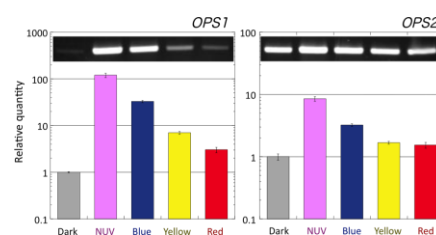


図2 オプシン様遺伝子の発現解析  
各種蛍光灯を1時間照射した。棒グラフは、Real-time PCRの結果を、写真は、RT-PCRの電気泳動写真を示す。

##### (5) 野外における胞子形成調査

イネごま葉枯病菌の光環境応答の生態学的意義を明らかにするため野外実験を行なった。晴天時や曇天時を含む様々な気象条件のもとで、太陽光を一定時間照射し、胞子形成数を調査した。その結果、晴天時の方が曇天時と比較して有為に胞子形成数が多かった。しかしながら、胞子形成を誘導する紫外

線と孢子形成を阻害する青色光の割合に対する孢子形成の傾向については明らかにできず、今後さらに調査・解析を行なう予定である。

#### (6) 病害拡大のモニタリング実験系の確立

孢子飛散による病害の広がりを小規模でモニタリングするための実験系を確立した。50cm 四方のシードリングトレーにイネ種子を播種し、3-5 葉期まで育てた。そこに、病斑を形成したイネ苗をおき、一定期間ごとに病斑の広がりを調査した。その結果、紫外線カットフィルムを用いた場合、対象区と比較して、イネごま葉枯病の発病程度が低い傾向が認められた。また、青色光を付加照射した場合も、発病程度が低い傾向が認められた。引き続き実験を行ない、光質環境の制御による孢子形成の抑制を利用したイネごま葉枯病菌の病害防除の可能性について引き続き検討する予定である。

#### (7) 紫外線防御関連遺伝子の機能解析

紫外線防御に関連するメラニンの植物病原糸状菌における役割を明らかにするため、メラニン合成系遺伝子破壊株を用いた病原性試験を行なった。メラニン合成系遺伝子破壊株をイネに接種すると、野生株と同様に病斑を形成したが、病斑上における孢子形成が野生株と比較して有為に低下した(図3)。したがって、イネごま葉枯病菌では、メラニンが、宿主内における菌糸伸展やその後の孢子形成に重要な役割を持つことが考えられ、イネいもち病菌等の付着器形成におけるメラニンの重要性とは異なるメラニンの役割がイネごま葉枯病菌にあることが示唆された。今後は、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する形質転換体を作成し、病斑内における菌糸伸展をGFP蛍光により観察する予定である。

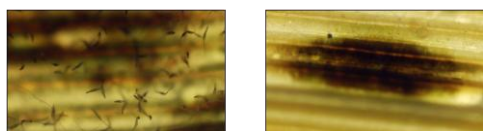


図3 病斑上における分生孢子形成  
左：野生株  
右：メラニン合成系遺伝子破壊株

### 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2件)

- ① Kihara J, Tanaka N, Ueno M, and Arase S (2009) Cloning and expression analysis of two opsin-like genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. FEMS Microbiology Letters (in press), 査読有

- ② Kihara J, Moriwaki A, Tanaka N, Tanaka C, Ueno M, and Arase S (2008) Characterization of the *BMRI* gene encoding a transcriptional factor for melanin biosynthesis genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. FEMS Microbiology Letters 281: 221-227. 2008年, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 木原淳一・上野誠・荒瀬榮, イネごま葉枯病菌の光環境応答—光による病害防除を目指して—, 日本農芸化学会2009年度大会(シンポジウム), 2009年3月29日, 福岡国際会議場(福岡市)
- ② 木原淳一・田中のぞみ・森脇明弘・上野誠・荒瀬榮, イネごま葉枯病菌(*Bipolaris oryzae*)の青色光制御遺伝子破壊株における近紫外線誘導遺伝子の発現解析, 第8回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2008年11月17日, 石川県文教会館(金沢市)
- ③ Kihara J, Moriwaki A, Tanaka N, Ueno M, and Arase S, Photoresponses of the rice brown spot fungus *Bipolaris oryzae*, 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, 2008年8月, Lingotto Conference Centre (Turin, Italy)
- ④ 田中のぞみ・森脇明弘・山口裕一郎・上野誠・荒瀬榮・木原淳一, Suppression Subtractive Hybridization法を用いたイネごま葉枯病菌の光調節遺伝子の探索, 平成19年度日本植物病理学会関西部会, 2007年10月7日, 岐阜大学(岐阜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kankyuu.shimane-u.ac.jp>

### 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：