

平成24年 2月20日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20580117

研究課題名(和文)

生物間相互作用に関わるセスキテルペンの構造多様性を生み出す遺伝的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of genetic mechanisms that generate structural diversity of a group of sesquiterpenes involved in plant-microbe interactions

研究代表者

木村 真 (KIMURA MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号： 20261167

研究成果の概要(和文)：

ムギ類に深刻な病害を起こす赤かび病菌 *Fusarium graminearum* は感染因子としてトリコセシンと総称されるセスキテルペン毒素を生産する。本毒素の側鎖多様性を生み出すメカニズムとして、C-4 位のアセチル基の有無を決定する C-4 デアセチラーゼ遺伝子 *Tri104* を生合成遺伝子クラスター外から単離、同定した。*Tri104* は液体培地ではなく固体培地で発現しており、固体培地で培養した時のみ C-4 位のアセチル基がはずれる事実と一致していた。

研究成果の概要(英文)：

Fusarium graminearum, a head blight fungus that causes devastating disease of wheat and other important cereal crops, produces trichothecene mycotoxins, a diverse group of sesquiterpene secondary metabolites. They are also known to act as a virulence factor of this pathogen. In an attempt to elucidate the mechanisms that generate the diversity of side chains, we have identified and characterized a C-4 deacetylase gene, *Tri104*, outside of the gene trichothecene cluster. *Tri104* was expressed when the fungus was grown on solid rice (SR), but not on liquid rice flour (RF) medium. This result coincides with the fact that the fungus produces nivalenol, a trichothecene with a hydroxyl at C-4, only on SR (but not on RF) medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード： Biosynthesis, Deacetylase, *Fusarium graminearum*, Nivalenol, Trichothecenes

1. 研究開始当初の背景

赤かび病は、*Fusarium graminearum* 等のフザリウム属菌（赤かび病菌）がムギ類やトウモロコシ等の主要穀類に感染し、収穫の低減をもたらす難防除病害である。近年の気候変動（温暖化）も影響して、これまで赤かび病が問題とならなかった地域を含めて広範囲に発生するようになり、世界的な問題に発展した。赤かび病にかかると人畜に有害なトリコテセン系毒素で穀粒が汚染するため、収穫量の低減だけでなく食の安全性の観点からも大きな問題となっている。

トリコテセン系毒素のうちでもデオキシニバレノール（DON）汚染が欧米で非常に大きな問題となり、我が国でも食糧の安全供給の観点から DON の暫定基準値 1.1 ppm が定められた。しかし DON だけでなく、基本骨格への修飾基や着脱のパターンの異なるトリコテセン系毒素が存在し、例えばニバレノール（NIV）などは DON よりも強い毒性を示す。それぞれの生産菌株によってどの側鎖修飾のパターンになるかは生産菌において遺伝的に決まっている（ケモタイプと呼ばれる）が、欧米と比べ日本やアジアでは NIV 系トリコテセンを生産する株が高い割合で存在するので、これらに対しても十分な検査が必要であると指摘されている。また、DON や NIV の特定の水酸基がアセチル化修飾を受けた類縁体も穀類へ混入し得るので、これらの類縁体に対してもリスク評価や汚染調査が必要となる。しかしながら科学的な知見は十分でない。

トリコテセンはセスキテルペンと総称される二次代謝産物であり、病原菌と宿主植物の相互作用に関与する生理活性物質で、その側鎖構造の違いによって植物に対する作用が大きく異なる。しかしながら、どのようにして赤かび病菌が構造多様性を示すトリコテセンの特定の分子種を生産するのかその遺伝学的なメカニズムについては解明されていない状況にある。

2. 研究の目的

NIV の生合成では、一旦 C-3, C-15, C-4 の全ての位置がアセチル化を受けた後に C-3, C-15, C-4 の順に脱アセチル化を受ける。C-4 は米固体培地（SR）上で培養すると脱アセチル化が起こるが、米煮汁培地（RF）で培養するとアセチル基は一切はずれない。このことは、後期生合成における未同定の経路酵素遺伝子（ここでは *Tri104* とする）が SR 培地でのみ選択的に発現していることを示唆する。そこで本研究では NIV の後期生合成

経路を解明する一環として 4-acetylnivalenol (4-ANIV) の脱アセチル化に関与する *Tri104* を同定・単離し、その性質を明らかとすることを目的として研究を進める。

3. 研究の方法

Tri104 の単離、*F. graminearum* の遺伝子操作、遺伝子機能解析、トリコテセンの解析は以下に示す方法で行った。

Tri104 の単離

C-3 位の脱アセチル化を行う酵素として見つかっている *Tri8* と高い相同性を示す遺伝子を、ゲノム配列決定株である *F. graminearum* PH-1 株の配列を含む *Fusarium* 比較ゲノムデータベース

(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html) を用いて探索した。その結果、アミノ酸配列で TRI8 と 58% の相同性を示すリパーゼと相同性を示す遺伝子 FGSG_03846.3 が見いだされた（後の解析から示されるが、この遺伝子はトリコテセン C-4 デアセチラーゼであり、*Tri104* と名付けた）。この配列に基づき、まず本研究で供試した MAFF 111233 株の *Tri104* の周辺配列を決定し、その配列に基づいて以下の遺伝子破壊用のプライマーを設計した。

dTri104_1F_BglII

(5'-TTAGATCTAGTGGTGAGGATAGACTTATC-3')

dTri104_2R_BglII

(5'-TTAGATCTTTGACTACTCCGGAAACGA-3')

dTri104_3F_NotI

(5'-AAGCGCCCGGAGTTTGTTAATACTGG-3')

dTri104_4R_SpeI

(5'-TAACTAGTCTTTAAAGACGGCATGAAC-3')

F. graminearum の遺伝子操作

・スフェロプラストの作成

PDA medium で平板培養した *F. graminearum* の菌糸片を、300 mL 三角フラスコに入った 100 mL の CMC medium (carboxy methyl cellulose sodium salt (WAKO, Osaka, Japan) 1.5 %, NH₄NO₃ (WAKO) 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.05 % を加熱しながらスターラーでよく混ぜ、最後に yeast extract 0.1% を加えた) に植菌し、125 rpm、28 °C で 72 時間振盪培養した。培養した菌糸は茶こしで回収し、滅菌水で十分に洗浄後、フィルター濾過滅菌を行った酵素液 (driserase (SIGMA) 20 mg/mL、lysing enzyme (SIGMA) 30 mg/mL in OM buffer (1.2 M MgSO₄ (WAKO)、10 mM sodium phosphate buffer (10 mM NaH₂PO₄、10 mM Na₂HPO₄) pH5.8) に懸濁した。28 °C で緩やかに振盪を 5 時間行い、スフェロプラストを分離させた。

・形質転換

1×10⁷ /mL のスフェロプラスト懸濁液 500μL にリニアライズしたベクター (20~30 μl) を加え、1ml の PEG 溶液 (60% PEG4000、10 mM Tris-HCl

pH7.5、10 mM CaCl₂) を少しずつ加えた。28 °C で30分静置後、4 mLのYS medium (yeast extract 0.5%、0.8 M sucrose) を加え、28 °C で12時間振盪培養した。スフェロプラストの再生後、培養液をセレクションマーカーの hygromycin B (終濃度 30 µg/mL) を含む down agar (yeast extract 0.5%、glucose 2%、agar 1.5%、0.8 M sucrose) プレートに撒き、同じく hygromycin B (終濃度 30 µg/mL) を含む Top agar (agar 1%、yeast extract 0.5%、0.8 M sucrose) を重層し、28 °C で培養した。得られた形質転換体をセレクションマーカーの hygromycin B (終濃度 100 µg/mL) を含む YG medium プレートに植菌してセレクションを行った。

・Total RNA 抽出

CMC 培地で前培養し、3000rpm、15min 遠心し (LC-122, rotor R10A2, TOMY)、菌体を回収した後に滅菌水で洗浄し、滅菌水で再懸濁した液 5 ml を 300 ml 三角フラスコに入った 100 ml の RF medium 及び YG medium (yeast extract (DIFCO) 0.5%、glucose 2%) に植菌し、170 rpm、20 °C で48時間回転培養した。培養した菌糸は茶こしで回収し、ペーパータオルで水気を取り除いた。SR medium の場合はピンセットを用いて菌糸を回収した。菌体の破碎には乳鉢を使用し、液体窒素を加えながらパウダー状になるまで破碎した。破碎した菌糸 0.5 g に対し、1 ml の TRIzol Reagent (invitrogen) を加え、よく懸濁した後に 1 ml ずつ 1.5 ml tube (Treff Lab) に移した。各チューブに 200 µl のクロロホルムを加え、回収した上清にイソプロパノールを 700 µl 加えて RNA を沈殿させた。この RNA を 70% エタノールで洗浄し、RNA Storage Solution (Ambion) に溶解した。RT-PCR は DNase (invitrogen) で DNA を除き、エタノール沈殿したサンプルを用いた。

遺伝子機能解析

・遺伝子破壊ベクターの構築

遺伝子破壊ベクターは inverse PCR (IPCR) 法に基づき作製した。Ex Taq (Takara) を用いて *Bg*III の制限酵素認識部位を付加した inward primer dTri104_1F_BglIII と dTri104_2R_BglIII で PCR を行い、PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) で精製した。PCR 産物をプライマーに付加した制限酵素 *Bg*III で処理し、MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) で精製後、DNA ligation kit 2 (Takara) でセルフライゲーションした。このサンプルを Second PCR の鋳型とした。このサンプルを鋳型にし、Ex Taq (Takara) を用いて、*Not*I と *Sa*I の制限酵素認識部位を付加した outward primer dTri104_3F_NotI と dTri104_4R_SpeI とで PCR を行い、PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) で精製した。次に、プライマーに認識配列を付加した制限酵素 *Not*I と *Sa*I を用いて PCR 産物を

処理し、MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) で精製することで、遺伝子破壊ベクター構築におけるインサートフラグメントとした。

セレクション用のマーカー遺伝子を持つベクター pCSN43 を制限酵素で処理し、MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) で精製した。このベクターとインサートフラグメントを DNA ligation kit 2 (Takara) でライゲーションした。遺伝子破壊ベクターは *Bg*III で処理してリニアライズした後、形質転換に使用した。

・機能相補ベクターの構築

pHF312 から *gpd* terminator, *trpC* promoter, *hph* (ハイグロマイシン B 耐性遺伝子), *trpC* terminator を含む配列制限酵素 *Sa*II, *Not*I で処理し MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) で精製することで 3kbp の断片を得た。この断片を同じく *Sa*II, *Not*I で消化した pCSN43 に組み込むことで pCSN43-Tgpd を得た。次いで *F. graminearum* MAFF111233 のゲノムをテンプレートにし、プライマー (#17, #18) を用いて PCR により *Tri104* を増幅し、*Eco*RV, *Sph*I で消化した pCSN43 に組み込むことで pCSN43-Tri104 を得た。pCSN43-Tgpd を *Sph*I, *Xho*I で消化して MiniElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) で精製後得た 3kbp の断片を、*Sph*I, *Xho*I で処理した pCSN43-Tri104 と DNA ligation kit 2 (Takara) を用いてライゲーションさせることで pCSN43-Tri104-Tgpd を得た。*Aspergillus nidulans* のゲノムをテンプレートとし、プライマー (#15, #16) を用いて PCR により translation elongation factor (TEF) 1 α promoter を増幅した。この PCR 断片を *Not*I で消化した後精製し、*Not*I, *Eco*RV で消化した pCSN43-Tri104-Tgpd と DNA ligation kit 2 (Takara) を用いてライゲーションさせることで pCSN43-TEF-Tri104-hph を構築した。

トリコセシンの解析

・固体培地からの抽出

CMC 培地で前培養し、3000rpm、15min 遠心し (LC-122, rotor R10A2, TOMY)、菌体を回収した後に滅菌水で洗浄し、滅菌水で再懸濁した液 2 ml を、100 ml 三角フラスコに入った 5g の SR medium (秋田県産あきたこまち 10 g に対して 5 ml の蒸留水を吸収させ、オートクレーブ (121 °C, 20min) した) に植菌し、25 °C で静置培養した。20 ml の 86% アセトニトリル (AcCN) を加え、30分震盪した後に、ろ紙を通し、さらに Autoprep MF-T 1500 で精製し、N₂ ガスを吹きつけて乾燥させた。サンプルは AcCN (TLC 解析) または、AcCN : MetOH : H₂O (5 : 5 : 90) 混合液 (HPLC 解析)、それぞれの目的にあった溶液に再溶解して解析に用いた。

・液体培地からの抽出

平板培養したプレートの菌糸片を、100 ml 三角フラスコに入った 20 ml の RF medium (rice flour 5% (秋田県産あきたこまちを粉末にし、50 g/L になるよう水を加え 30分煮た後、ふるい (Nonaka Rikaki testing sieve, Opening 180µm, Wire 125µm) を用いて濾した)、yeast extract 0.1%、sucrose 3%) に植菌し、170 rpm、20 °C で 96 ~ 120 時間回転培養した。菌糸を含む培養液 5 ml を

等量の酢酸エチルで抽出し、N₂ガスを吹きつけて乾燥させた。抽出したサンプルは酢酸エチル、またはエタノールに再溶解してTLC解析に用いた。

・TLC解析

抽出したサンプルの解析にTLCプレートに20×20 Silica gel 60F₂₅₄ (Merck Japan Limited, Tokyo) を用い、展開溶媒は酢酸エチルとトルエンを3:1に混合したものを使用した。展開したTLCプレートにNBP溶液(4-(p-nitrobenzyl)pyridine (WAKO) を最終濃度1%になるように溶媒(クロロホルム/四塩化炭素 = 2:3)に溶解させ調製)を噴霧し風乾後、ホットプレート上で150 °C、30分間熱をかけた。プレートが冷めた後TEPA溶液(tetraethylenepentamine (WAKO) を最終濃度10%になるように溶媒(クロロホルム/四塩化炭素 = 2:3)に溶解させ調製)を噴霧し、トリコテセン骨格の12, 13-エポキシ環に起因する青または紫色のスポットを検出した。

・HPLC解析

解析にはSCL-10A (Shimadzu)、およびPEGASIL ODS column (内径 4.6 mm、長さ 250 mm (Senshu Scientific Co) を使用し、220 nmのUVによって検出を行った。この際、流量は1 ml/min、カラムの温度は40°Cに調節した。移動相にはアセトニトリルと水を以下のプログラムで用いた。

NIV, 4-ANIV, 4,15-diANIV separation program (0-10 min: 10% AcCN isocratic, 10-35 min: 35% AcCN gradient, 35-40min: 35% AcCN isocratic, 40min Stop)

4. 研究成果

まず、*Fusarium* ゲノムデータベースから見いだした *Tri104* 候補遺伝子の遺伝子発現の調査および酵素活性を検証した。次に、*Tri104* を標的破壊することによってその機能を実証し、次に相補させることで破壊実験の結果が真に目的遺伝子の破壊によって得られたものであることを証明した。

*Tri104*の発現解析とC-4位脱アセチル化酵素活性

Tri104 はその発現条件についても知られていない。そのため YG、RF、SR の各培地で培養した *F. graminearum* を用い RT-PCR を行った。その結果、SR の培地では発現が確認できたが、トリコテセン生産培地である RF 培地からは発現が確認できなかった。非生産培地である YG 培地からはごくわずかの発現の確認が出来た (図1)。

RT-PCR を行ったものと同条件で培養した菌株からタンパク質を抽出し、C4位脱アセチル化酵素の活性確認を行った。その結果 *Tri104* が発現していた SR 培地で培養した菌株からはC-4位脱アセチル化活性が確認できた。発現していなかった RF 培地および YG 培

地で培養した菌株からは活性がほとんど確認できなかった。RT-PCR と活性の有無に相関が見られた (図2)。

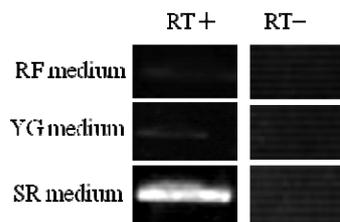


図1: *Tri104*の発現解析

それぞれ3日間培養した菌糸を集めてRNAを抽出し、RT-PCRによって *Tri104*の発現を調べた。

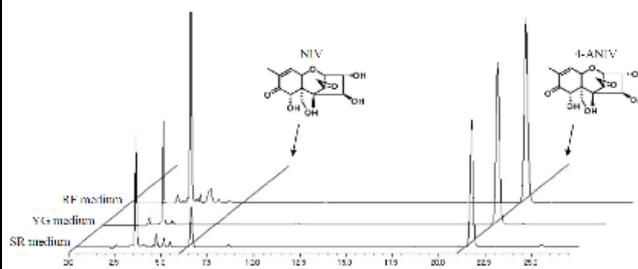


図2: C-4脱アセチル化活性の発現解析

上記のRNA解析に用いた菌糸からタンパクを抽出し、4-ANIVを基質として酵素活性を調べた。

*Tri104*の標的破壊と破壊株が生産するトリコテセンの解析

図3に *Tri104* 破壊候補株のサザン解析の結果を示す。Δは破壊がうまくいっていた株、ectopicはゲノムの非相同領域に組み込まれてしまった株である。

Tri104 破壊株の生産するトリコテセンの同定の為、SR medium で2週間静置培養したものから抽出したトリコテセンの一部をサンプルとし、TLC解析を行った (図4)。その結果、破壊株である2株 (図4でそれぞれ左から 1-B2, 1-C1) では NIVの生産が大きく減少していることが示された。

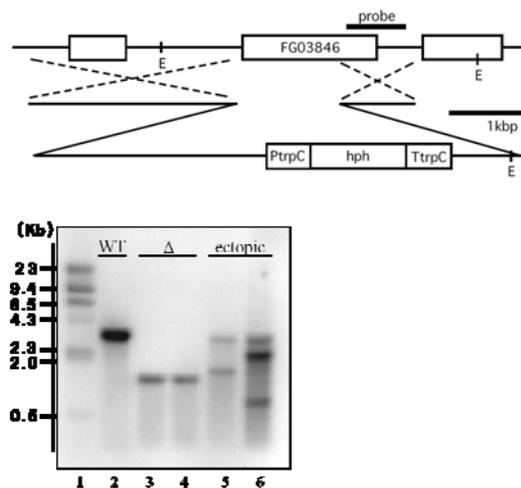


図3: *Tri104*破壊体作出の設計とサザン解析による

候補株の探索

hygromycin B (*hph*) 耐性遺伝子が *Tri104* (FG03846) のコード領域に置き換わると、EcoRV (E) 消化したゲノムプロットで図中のプローブを用いると約 1.3 kb のバンドを生じる。

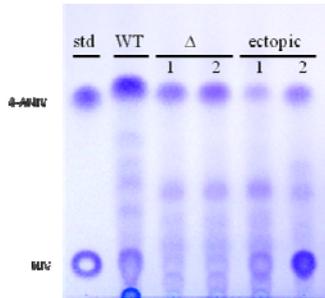


図 4 : *Tri104* 破壊体のトリコテセン解析

14 日間 SR 培地で培養した菌体から抽出した後、TLC で解析した。

Tri104 の遺伝子発現株の過剰発現による相補

F. graminearum に pCSN43-pTEF-*Tri104*-*hph* ベクターを導入することで形質転換を行った。その結果、セクションマーカーである hygromycin B に耐性を持つ形質転換体が 5 株得られた。*Tri104* の発現確認のため、YG 培地で 3 日間培養した *Tri104* 過剰発現株から total RNA を抽出し、これらを用いて RT-PCR を行った。その結果 *Tri104* は過剰発現株 C40X-C においてのみ発現の確認ができた (図 5)。

次に C40X-C を用いて C-4 脱アセチル化酵素の活性確認を行った。WT や 1-B2 では YG 培地で培養した菌体から抽出したタンパク粗抽出画分の活性はほとんど確認できなかったが、C40X-C では強い活性を示し、4-ANIV から NIV への変換が見られた (図 6)。また 4, 15-diacetylnivalenol (4, 15-diANIV) や 3, 4, 15-triacetylnivalenol (3, 4, 15-triANIV) を添加したところ、WT と 1-B2 では 4, 15-diANIV からは C-15 位の脱アセチル化が起こり、4-ANIV の蓄積が見られた。また 3, 4, 15-triANIV からは C-3 位の脱アセチル化および C-15 位の脱アセチル化が起こり、4, 15-diANIV と 4-ANIV の蓄積が見られた。C40X-C ではさらに C-4 位の脱アセチル化が起こり、15-ANIV、NIV の蓄積も見られた (図 7)。

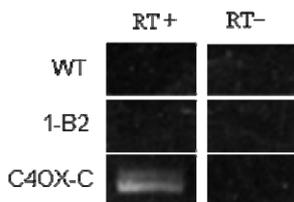


図 5 : *Tri104* の発現解析

それぞれ YG 培地で 3 日間培養した菌糸を集めて RNA を抽出し、RT-PCR によって *Tri104* の発現を調べた。WT ; 非組換え体、1-B2 ; *Tri104* 破壊株、C40X-C ; 過剰発現による相

候補株

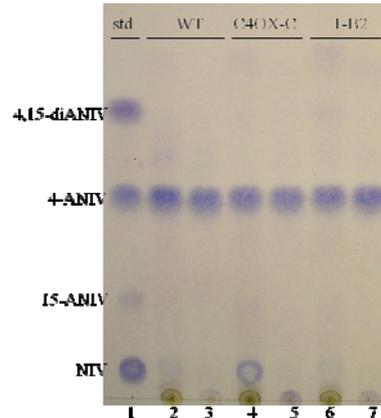


図 6 : タンパク粗抽出画分を用いた C-4 脱アセチル化活性の検定

1, standard; 2, 4, 6, no-treatment; 3, 5, 7, heated

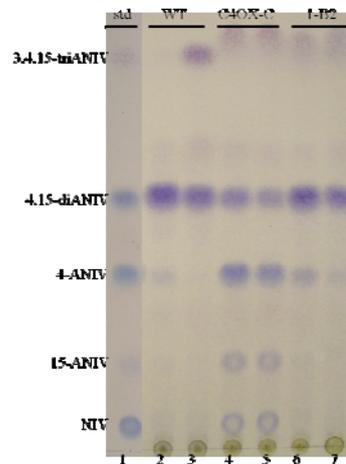


図 7 : タンパク粗抽出画分を用いた C-4 脱アセチル化活性の検定

1, standard; 2, 4, 6; 4, 15-diANIV; 3, 5, 7, 3, 4, 15-triANIV

Fusarium 属菌以外の菌の有する C-4 脱アセチル化酵素活性

当初、*Tri104* を過剰発現させたトリコテセン非生産菌を宿主に NIV 後期生合中間体をフィーディングすることによって、他の生合成経路酵素の作用を受けることなく *TRI104* の各種トリコテセン基質に対する活性のみを評価するための実験を計画していた。研究室内にある *Magnaporthe oryzae* を用いて *Tri104* の異種発現を検討していたが、驚くべきことに YG 培地で培養した *M. oryzae* から非常に強い (少なくとも YG 培地での培養では *F. graminearum* では検出されない) トリコテセン C-4 脱アセチル化酵素活性が見いだされた。このことはもともと基質特異性の広いリパーゼが、たまたまトリコテセンという自らの二時代謝産物に作用しているだけであり、この C-4 脱アセチル化ステップが律速となって極めて NIV ができにくいという事実と一致している。恐らく *Tri8* はこのようなリパーゼのパラログが進化途上でよりトリコテセン (の C-3 位) に対して強い親和性を示すように

なり、特定のトリコテセン生産性 *Fusarium* の *Tri101* のようにクラスター中に移動して他の生合成遺伝子と同様の制御を受けるようになったのではないかと推測される。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

「ニバレノール生産菌はフザレノン X の C-4 位を脱アセチル化する酵素を有する」富永直樹、小関徳文、伊澤真澄、鎌倉高志、吉田稔、木村真 日本マイコトキシン学会第 67 回学術講演会 2011 年 1 月 8 日 (東京)

[図書] (計 0 件)

準備中

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 真 (KIMURA MAKOTO)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

20261167

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

富永直樹 (東京理科大学・理工学部修士課程)

前田一行 (明治大学・農学部農学科博士課程)