

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658041

研究課題名（和文）植物病原菌と昆虫病原菌における共通毒素生産に依存した病原性発現機構の比較解析

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of pathogenicity of phytopathogenic and entomopathogenic fungi based on a common toxin production

研究代表者

児玉 基一郎 (KODAMA MOTOICHIRO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00183343

研究成果の概要（和文）：

Alternaria 属植物病原菌および *Metarhizium* 属昆虫病原菌は、それぞれの宿主植物および昆虫に対して毒性を示す毒素デストラキシンを生産する。一方、*Fusarium* 属植物病原菌および *Beauveria* 属昆虫病原菌ともに毒素ボーベリシンを生産する。これらの毒素はいずれも環状ペプチド構造を有する。本研究では、植物病原菌と昆虫病原菌という全く異なる病原体における共通毒素生産の病理学的意義を明らかにするため、毒素合成遺伝子の単離と機能解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：

A phytopathogen *Alternaria* and an entomopathogen *Metarhizium* produce the common toxin destruxin and infect plant and insect hosts, respectively. On the other hand, a phytopathogen *Fusarium* and an entomopathogen *Beauveria* produce the common toxin boubericin. Both toxins are cyclic peptides. To elucidate pathological roles of those common toxins produced by both phytopathogenic and entomopathogenic fungi, cloning and characterization of genes for the toxin biosynthesis in those pathogens have been tried in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物病原菌、昆虫病原菌、毒素、病原性

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌と昆虫病原菌は、従来、宿主があまりにも異なるため個別の研究対象となっており、それぞれの系において、基礎・応用両面での研究が遂行されてきた。申請者らは、これまで植物病原糸状菌の病原性発現機構に関して、特に糸状菌の二次代謝産物合成と病原性の関わりについて研究を進めてきた。植物病原糸状菌由来の毒素の中で、環状ペプチドを含む非リボソーム型ペプチド系化合物は多様な生理活性を有することが知られている。申請者らは、リンゴ斑点落葉

病菌由来の AM 毒素（環状デプシペプチド）合成に関わる非リボソーム型ペプチド合成酵素（NRPS）〔特に、環状ペプチド合成酵素（CPS）〕遺伝子をクローニングし（AMT と命名）その病理学的役割を明らかにした。また、*Alternaria brassicae*（アブラナ科植物黒斑病菌）は、同じく環状ペプチドであるデストラキシン類を生産し、その病原性との関わりが議論されている。一方、多くの重要植物病原菌を含む *Fusarium* 属菌は、やはり環状ペプチドのボーベリシンを生産する。デストラキシンおよびボーベリシンは、もともと昆

虫病原菌である *Metarhizium* 属菌、および *Beauveria* 属菌の生産する毒素として報告されたものである。歴史的に *M. anisopliae* はカイコ黒きょう病菌、*B. bassiana* はカイコ白きょう病菌として有名であり、また両属菌は、数多くの昆虫種に病原性を示すこともよく知られている。これらの菌は、害虫のバイオコントロールにおける微生物資材として活用されており、世界的にも研究が活発である。

2. 研究の目的

Alternaria 属植物病原菌および *Metarhizium* 属昆虫病原菌は、それぞれの宿主植物および昆虫に対して毒性を示す毒素デストラキシンを生産する。一方、*Fusarium* 属植物病原菌および *Beauveria* 属昆虫病原菌ともに毒素であるボーベリシンを生産し、それぞれ宿主植物あるいは昆虫を加害する。これらの毒素はいずれも環状ペプチド構造を有するが、その生合成の分子機構は明らかとなっていない。本研究では、植物病原菌と昆虫病原菌という全く異なる病原体における共通毒素生産の意義および病原性進化との関連を、毒素生合成遺伝子の単離と機能解析を通して分子レベルで明らかにすることを旨とする。植物病原菌／昆虫病原菌の生産する共通毒素の病理学的重要性を共通のプラットフォームで議論するという点において、独創性の高い研究課題であると考えられる。

本研究計画では、植物病原菌と昆虫病原菌より、NRPS 遺伝子をクローニングし、遺伝子ターゲットングによる目的遺伝子の特異的ノックアウト法を用いて、得られた候補遺伝子の機能解析、すなわち毒素生合成への関与を証明する。最終的にデストラキシンおよびボーベリシン生合成に関与する遺伝子を突き止め、これら化合物の植物病原菌および昆虫病原菌両者における病原性発現への関与を明らかにする。このデータと、NRPS 遺伝子の分子系統解析に基づく結果より、これら遺伝子の進化と機能分化について考察する。

本研究課題において、デストラキシンおよびボーベリシンというよく知られた毒素の病原性への関与が証明され、植物病原菌と昆虫病原菌を包含した進化論的な議論が成されれば、世界的にもユニークかつ影響力のある成果を提示できるものと考えられる。また、材料となる昆虫病原菌はバイオコントロール分野においても重要視されている。さらに、ボーベリシンは、冬虫夏草の成分として、抗腫瘍活性も注目されている。そのため、本研究は単なるモデル実験系にとどまらず、研究成果を現場に還元することも予期される。

3. 研究の方法

本課題では研究計画を達成するために、以

下の検討を行う。

- (1)昆虫病原菌 *Metarhizium anisopliae* および *Beauveria bassiana* 由来 NRPS(CPS)遺伝子断片のクローニング
- (2)植物病原菌 *Alternaria brassicae* および *Fusarium oxysporum* 由来 NRPS(CPS)遺伝子断片のクローニング
- (3)候補 NRPS 遺伝子断片の各菌株（毒素生産菌および非生産菌）における分布調査と発現解析による絞り込み
- (4)選抜候補 NRPS 遺伝子断片を用いた遺伝子ノックアウト (KO) 実験
- (5)KO 変異株における毒素生産能と病原性検定

研究プランは多岐にわたっているため、すべての項目について同時達成を目指すのではなく、それぞれ並行して進め、年次の進行に伴いデータを評価して、有望な項目について集中して行う。

昆虫病原菌 *M. anisopliae*（デストラキシン生産菌）および *B. bassiana*（ボーベリシン生産菌）、また、植物病原菌 *A. brassicae*（デストラキシン生産菌）および *F. oxysporum*（ボーベリシン生産菌）において、ゲノム DNA 由来 NRPS(CPS)遺伝子断片のクローニング（ディジェネレート PCR 法による）を行う。さらに、クローニング断片のシークエンシング・相同性解析を行う。また、*B. bassiana* および *A. brassicae* においては、次世代型シークエンサーによるドラフトゲノム解析を行い、ゲノム情報を取得する。

引き続き、候補 NRPS 遺伝子断片の各菌株（毒素生産菌および非生産菌）における分布調査と発現解析による絞り込みを以下のように行う。

- ①配列特異的 PCR、サザン解析
- ②RT-PCR による発現解析（毒素生産菌株／非生産菌株、あるいは毒素生産／非生産条件下における発現比較調査）

候補遺伝子が確定すれば、以下の方法により選抜候補 NRPS 遺伝子断片を用いた遺伝子ノックアウト (KO) 実験を行い、機能解析を試みる。

- ①遺伝子 KO ベクターの構築と相同組換えによる遺伝子破壊
 - ②組換え体における毒素生産能・病原性検定
- さらに、以下のように、毒素生合成遺伝子全長のクローニングを行う。
- ①ライブラリースクリーニング (*Alternaria* および *Fusarium* 菌株についてはライブラリー構築済み)
 - ②遺伝子全長のクローニング、シークエンシング

なお、ドラフトゲノム解析情報により、遺伝子全長が明らかになれば、フランキング領域の解析をさらに進め、遺伝子クラスターの全体像を明らかにする。さらに、遺伝

子機能の比較・系統解析・進化学的検討も可能であれば進める。

4. 研究成果

昆虫病原菌 *M. anisopliae* および植物病原菌 *A. brassicae* において、次世代シーケンサーによるドラフトゲノム解析を遂行した。シーケンスデータに基づき、Blast サーチによる非リボソーム型ペプチド生合成酵素 (NRPS) (環状ペプチド生合成酵素) 候補遺伝子のカタログ化を行った。さらに、植物病原菌 *F. oxysporum* に関しては公共 DB を利用し、同様に NRPS 候補遺伝子を同定した。それぞれの候補遺伝子内におけるドメイン予測により、さらに、デストラキシン生合成に関与すると考えられる NRPS 遺伝子を絞り込んだ。遺伝子機能解析のため、昆虫病原菌 *M. anisopliae* および植物病原菌 *A. brassicae* において、形質転換系および遺伝子ノックアウト系の確立を進めた。

具体的な結果は以下である。

(1) *M. anisopliae* のドラフトゲノム解析と NRPS 遺伝子配列の検出

ゲノムドラフト塩基配列解析は、454 FLX Titanium (ロシュ) によって行った。得られた 7216 (≧500 bp) のコンティグをデータベースとし、菌類の各種 NRPS 遺伝子をクエリーとしてローカル BLAST 検索を行った。NRPS を含むと推定されたコンティグに対して Soft Berry FGENESH による ORF 予測、BLASTP および InterProScan によるドメイン予測を行った。得られた候補遺伝子は、PCR により *M. anisopliae* の他の株 (KM-25) における分布も調べた。

ドラフトゲノム解析より、総計 206 Mb のドラフト配列から約 35 Mb のシングルリード配列が得られ、解析配列は本菌ゲノムの 95% 以上をカバーしていると推定された。ローカル BLAST 検索より、20 の NRPS 候補遺伝子を同定した。*M. anisopliae* KM-455 菌株と KM-25 菌株におけるこれら 20 遺伝子の分布を PCR で確認したところ、18 遺伝子は両菌株で増幅産物が検出された。デストラキシン B はその化学構造から、6 つのモジュールを保有することが推測されるため、18 遺伝子の中でモジュール数が適合する NRPS-1558 を、デストラキシン B 生合成 NRPS 候補遺伝子として以後の実験に使用した。

(2) NRPS 候補遺伝子のノックアウト (KO) 実験

候補遺伝子の KO には、fusion PCR と PEG 法を用いた。まず、候補遺伝子の ORF を部分的にピアラフォス耐性遺伝子 (*bar*) と置換させるため、*bar* および置換部分の両サイド約 1 kb を PCR により増幅した。これら 3 断片を fusion PCR し、KO 用コンストラクトを得た。KM455 株のプロトプラストと先のコン

ストラクトを混合し、PEG 法により形質転換した。ピアラフォスを含む選択培地で 3 度選抜した後、DNA を抽出し、相同組込みの確認を PCR で行った。

NRPS-1558-*bar* 遺伝子コンストラクトにより KM-455 菌株を形質転換した結果、現在までに 41 のピアラフォス耐性形質転換体を得られた。これら 41 菌株のうち 20 菌株について、相同組込みを PCR により確認した。その結果、20 菌株全てが *ectopic* 株であることが示された。現在、残りの候補株において相同組込みの確認を行うとともに、新たなピアラフォス耐性形質転換体を調製し、KO 株作出を試みている。

(3) *M. anisopliae* の CD 染色体由来 NRPS 遺伝子のクローニング

M. anisopliae において、conditionally dispensable (CD) 染色体の欠損がデストラキシン生産能の失活を誘起することが報告されている。そこで、*M. anisopliae* の CD 染色体由来 NRPS 遺伝子のクローニングを以下のように試みた。

M. anisopliae の CD 染色体にデストラキシン B 生合成遺伝子が座乗している可能性が高いことから、*M. anisopliae* KM-455 菌株の染色体をパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて分離した。1.3 Mb の CD 染色体由来 DNA を抽出し、REPLI-g (Qiagen) で DNA を増幅した。得られた CD 染色体由来 DNA を鋳型として、NRPS 遺伝子増幅用ユニバーサル PCR プライマーを用いて NRPS 遺伝子断片を増幅した。目的サイズの PCR 断片を TA クローニングし、シーケンス解析および相同性検索を行った。

M. anisopliae ゲノム DNA および CD 染色体由来 DNA を鋳型として、NRPS 遺伝子増幅用プライマーを用いた PCR により、予想サイズである約 300 bp および約 720 bp の増幅産物が得られた。本断片をサブクローニングし、計 144 クローンの塩基配列を決定した結果、異なる配列を示す NRPS 遺伝子断片が得られた。大部分のクローンは、従来 *M. anisopliae* から得られている 8 種類の NRPS 遺伝子クローンと同一であったが、新規 2 種類の NRPS 遺伝子クローン (kmorz-1、kmorz-6) を得ることができた。kmorz-1 は *Neosartorya fischeri* 由来の nonribosomal peptide synthase (XP_001267637)、また kmorz-6 は *Aspergillus clavatus* 由来の nonribosomal peptide synthase (XP_001273105) とアミノ酸レベルでそれぞれ 43%、38% の相同性を示した。

これら NRPS 遺伝子配列の分布を調査するため、それぞれのクローン毎に特異的な PCR プライマーをデザインして、*M. anisopliae*、*A. brassicae*、*A. alternata* (ナシ、リンゴ、トマト病原型)、*A. brassicicola* および *B. bassiana* 各菌株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。

その結果、km-12については *M. anisopliae* 由来 DNA のみにおいて予想サイズのパンドが検出された。一方、km-1 においては、*M. anisopliae* に加え *A. brassicae*、*A. brassicicola* および *A. alternata* から増幅産物が得られた。km-3、km-4、km-14、km-26、kморz-1 および kморz-6 においては、*M. anisopliae* および *A. alternata* から、km-18 においては、*M. anisopliae*、*A. brassicicola* および *A. alternata* から、km-22 においては、*M. anisopliae*、*A. brassicae* および *A. alternata* から増幅産物が得られた。

M. anisopliae 由来 NRPS 遺伝子クローンの 5 種類 (km-1、km-4、km-14、km-22 および km-26) について、毒素生産との関連を検討するため、KM455 菌株において遺伝子ターゲットングを試みた。その結果、km-1、km-4、km-14、km-22 および km-26 に関して、それぞれ、11 菌株、7 菌株、14 菌株、11 菌株および 19 菌株の形質転換体を得られた。しかし、PCR あるいはサザン解析による相同組換えの確認を行ったところ、いずれも ectopic 形質転換体であった。今後、引き続き NRPS 遺伝子クローンの遺伝子ターゲットングを継続して、デストラキシン B 生産との関連を検討する必要がある。

(4) *A. brassicae* 由来 NRPS 遺伝子のクローニング

A. brassicae ゲノム DNA を鋳型として同様に NRPS 遺伝子増幅用ユニバーサルプライマーを用いた PCR を行ったところ、予想サイズである約 300 bp、600 bp および 720 bp の増幅産物が得られた。300 bp の断片をサブクローニングし、塩基配列を決定した結果、1 種類の NRPS 遺伝子クローン (AB-1) が得られた。

以上の検討により、植物病原菌および昆虫病原菌において共通毒素生産に関与すると考えられる候補遺伝子が明らかとなった。今後、最終的にデストラキシンおよびボーベリシン合成に関与する遺伝子を突き止め、これら化合物の植物病原菌および昆虫病原菌両者における病原性発現への関与を明らかにしたい。さらに、それぞれの病原菌から得られた NRPS 遺伝子の交換実験により、例えば昆虫病原菌由来の遺伝子が植物病原菌中でも機能するかどうかを検定し、遺伝子機能の保存性、同義性について明らかにする。このデータと、NRPS 遺伝子の分子系統解析に基づく結果より、これら遺伝子の進化と機能分化について考察することが可能になると期待される。

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 5 件)

- (1) 赤木靖典、柘植尚志、児玉基一朗 : *Alternaria* 属菌の病原性進化. 植物防疫, 査読有、67 巻 3 号 : 15-19 (2013 年 3 月)
- (2) Naka, H., Suzuki, T., Watarai, T., Horie, Y., Mochizuki, F., Mochizuki, A., Tsuchida, K., Arita, Y., Ando, T. Identification of the sex pheromone secreted by *Synanthedon tenuis* (Lepidoptera: Sesiidae). Applied Entomology and Zoology, 査読有、48(1): 27-33, 2013.2.
- (3) Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. and Otani, H.: Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiology Review, 査読有、37: 44-66 (Jan. 2013) DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00350.x
- (4) Kheder A.A., Akagi, Y., Tsuge, T. and Kodama, M.: Functional analysis of the ceramide synthase gene *ALT7*, a homolog of the plant disease resistance gene *Asc1*, in the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 査読有、DOI 10.4172/2157-7471.S2-001 (Apr. 2012)
- (5) Kheder A.A., Akagi, Y., Yanaga, K., Maekiawa, N., Otani, H., Tsuge, T. and Kodama, M.: Functional analysis of the melanin biosynthesis genes *ALM1* and *BRM2-1* in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. Journal of General Plant Pathology, 査読有、78: 30-38 (Jan. 2012) DOI: 10.1007/s10327-011-0356-4

[学会発表] (計 10 件)

- ①高尾和実、赤木靖典、播本佳明、柘植尚志、難波栄二、児玉基一朗 : *Alternaria alternata* 病原菌の宿主特異的毒素生産における global regulator *LaeA* ホモログの関与. 日本植物病理学会大会 (岐阜市) (2013 年 3 月 28 日)
- ②Takao, K., Akagi, Takashi, Y., Tsuge, T. and Kodama, M.: *LaeA* regulate secondary metabolite in multi pathotypes of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡市) (2012 年 12 月 13 日)
- ③赤木靖典、播本佳明、柘植尚志、児玉基一朗 : 植物病原菌 *Alternaria alternata* が保有する病原性染色体の構造と機能 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡市) (2012 年 12 月 13 日)
- ④赤木靖典、播本佳明、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 : トマトアルターナリア茎枯病菌が保有する病原染色体の構造と機能. 平成 24 年度日本植物病理学会関西支部会 (鳥取市) (2012 年 9 月 28 日)
- ⑤高尾和実、赤木靖典、播本佳明、柘植尚志、尾谷 浩、児玉基一朗 : *Alternaria alternata* 病原菌における global regulator *LaeA* ホモログの機能解析. 平成 24 年度日本植物病理学会関

西部会（鳥取市）（2012年9月28日）

⑥児玉基一郎、赤木靖典、高尾和実、柘植尚志：植物病原糸状菌における二次代謝産物合成と病原性ーゲノム解析からみた進化・多様性ー。植物ー病原微生物の相互作用研究の新展開，平成24年度日本植物病理学会感染生理談話会（近江八幡市）（2012年9月1日）

⑦Akagi, Y., Tsuge, T. and Kodama, M.: Structure of a conditionally dispensable pathogenicity chromosome of the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, Japan (2012年8月1日)

⑧Akagi, Y., Harimoto, Y., Tsuge, T. and Kodama, M.: Structural analysis of a conditionally dispensable chromosome of the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. 2nd Japan-Korea Joint Symposium on Plant Pathology. Fukuoka, Japan (2012年3月27日)

⑨Akagi, Y., Takao, K., Harimoto, Y., Tsuge, T. and Kodama, M.: Pathogenicity chromosomes in host-specific toxin-producing *Alternaria* species. IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011 Congress. Sapporo, Japan (2011年9月8日)

⑩Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T. and Kodama, M.: Functional analysis of a global regulator, *LaeA* in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. Asian Mycological Congress 2011, Incheon, Korea (2011年8月9日)

〔図書〕（計2件）

(1) Johnson, R.D., Akagi, Y., Fleetwood, D.J., Gardiner, D.M., Kodama, M., Young, C.A., Voisey, C.R.: Fungal toxins of agricultural importance. *The Mycota*, Karl Esser et al. eds. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. (in press) (2013)

(2) 児玉基一郎、赤木靖典、高尾和実、柘植尚志：植物病原糸状菌における二次代謝産物合成と病原性ーゲノム解析からみた進化・多様性ー。植物ー病原微生物の相互作用研究の新展開（日本植物病理学会編，ISSN:1345-8086）。日本植物病理学会，東京，pp. 111-123（2012年9月）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 基一郎 (KODAMA MOTOICHIRO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号：00183343

(2) 連携研究者

中 秀司 (NAKA HIDESHI)
鳥取大学・農学部・助教
研究者番号：00443846