

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780044

研究課題名(和文)植物病原糸状菌の感染器官分化の制御に関する細胞内分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular network underlying the control of infectious morphogenesis in plant pathogenic fungi

研究代表者

辻 元人(Tsuji, Gento)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・講師

研究者番号：50381934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原菌において感染器官の形成は宿主植物への感染に必須の過程である。申請者はこれまでにウリ類炭疽病菌において、感染器官の1つである付着器の形成を制御する遺伝子CoKEL2を同定していた。本研究では、CoKEL2との相互作用が予想される因子を選抜し、それらの機能を調べた。その結果、CoKEL2を介した付着器形成の制御に関わる新規因子としてCoTea4の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：In many plant pathogenic fungi, formation of a specialized infection structure, named appressorium, is essential for the successful infection of host plants. In a plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*, CoKEL2 is essential for a proper morphogenesis of appressoria. This study was conducted to identify genes coding for proteins that can interact with CoKEL2. CoTEA4 was successfully identified as a novel regulatory gene that is involved in CoKEL2-mediated appressorium formation.

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：炭疽病 遺伝子 組み換え 極性 病理学 形態形成 付着器 糸状菌

### 1. 研究開始当初の背景

空気伝染性の植物病原糸状菌の多くは、宿主植物の葉上で孢子発芽をした後、感染器官である付着器を形成し、つづいて付着器から侵入菌糸を伸長させて、宿主内へ侵入を試みる。植物病原糸状菌の感染器官の形態分化は宿主植物への感染成立に必須の過程である。申請者はこれまで、炭疽病菌(*Colletotrichum* 属菌)を用いた系により、植物病原糸状菌の感染器官の形態分化と機能発現の分子機構に関して研究成果を蓄積してきた。特に、アグロバクテリウム形質転換法を利用した効率的な遺伝子タギング実験系を確立し、炭疽病菌の変異株ライブラリーの作成を完了していた。また、それに続く個々の変異株の解析により、本菌の感染器官の形態分化や機能発現に関与する遺伝子の同定に至っていた。

同定遺伝子の 1 つである *CoKEL2* 遺伝子は、Kelch-repeat と呼ばれるモチーフを持つタンパク質をコードしている。同モチーフを持つタンパク質としては、出芽酵母の *Kel1p* や分裂酵母の *Tea1p* が知られており、酵母においてこれらタンパク質は足場タンパク質として細胞生長端に局在し、細胞極性の制御に関与することが報告されている。炭疽病菌においても *CoKel2* タンパク質は発芽管や菌糸の先端といった細胞生長端に局在する。また *CoKEL2* 遺伝子変異株は付着器からの侵入菌糸形成時、その形成部位に異常を生じ、誤った方向に侵入菌糸を進展させるという特徴を示す。これらの結果は、酵母の *Kel1p* や *Tea1p* と同様に *CoKel2* が、足場タンパク質として本菌の感染器官形成時の細胞極性の制御に関与する可能性を強く示唆するものであった。一方、近年、糸状菌の細胞極性の制御に活性酸素生成系の関与が示唆されていた。炭疽病菌においても活性酸素生成酵素である NADPH オキシダーゼをコードする遺伝子の変異が、本菌の感染器官、特に侵入菌糸の形成に影響を与えることが明らかになっていた。さらに、活性酸素生成の制御に足場タンパク質 *CoBemA* が関与することを示唆する結果を得ていた。

### 2. 研究の目的

*CoKel2* および *CoBemA* の 2 種の足場タンパク質を切り口として、細胞極性の観点から感染器官分化を制御する細胞内分子ネットワークの解明を目指すのが、本研究の目的である。具体的なアプローチとしては、炭疽病菌において細胞極性の制御に重要な役割を持つ足場タンパク質 *CoKEL2* を軸とし、活性酸素生成の制御への関与が示唆される足場タンパク質 *CoBemA* を相互関連因子のターゲットとして焦点を当て、両者をつなぐ分子群の同定を試みる。本研究の成果は、両者を橋渡しする因子を同定し、その機能を明らかにすることによって果たされるものと考えられる。これにより本菌の感染器官分化の制御に関わる分子ネットワークの一端を解明できると期待する。

その成果は病原菌の感染機構の理解を助ける有益な基礎情報を提供するのみならず、病害防

除薬剤の開発研究の発展にも貢献できるものと考えられた。

### 3. 研究の方法

#### (1) *CoKel2* と相互作用する因子の探索

##### 酵母 Two-hybrid アッセイ

ウリ類炭疽病菌の感染器官形成時の cDNA ライブラリーの構築はすでに完了していた。そこで、*CoKEL2* をベイトとした酵母 Two-hybrid アッセイにより *CoKel2* と相互作用する因子をコードする遺伝子の探索を試みた。解析には MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System3(クロンテック社)を用いた。

##### プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイのための遺伝子タグとしては既存の FLAG や GST よりも高い親和性を持つとされる HaloTag アフィニティータグ(プロメガ社)を用いることにした。HaloTag 遺伝子を持つ市販のベクター pFC20A は哺乳類や細菌における細胞内発現用に開発されていることから、炭疽病菌の細胞内で発現させるためには糸状菌用にベクターを再構築する必要があった。そこで当該ベクターから HaloTag 遺伝子を切り出し、糸状菌のターミネーター配列およびマーカー遺伝子の上流に連結させたコンストラクトを構築し、既存のバイナリーベクターに導入した。構築したベクターを pGKG3HaloTrpT-S1 と命名した。本ベクターの HaloTag 遺伝子上流に目的遺伝子を導入することによって、アグロバクテリウム法による糸状菌への目的遺伝子の導入と菌体内での HaloTag 融合タンパク質の発現が可能となる。また、発現させた融合タンパク質については同社の HaloLinkResin を用いたプルダウンアッセイを行った。

##### ゲノム情報からの予測

本課題の採用年度にウリ類炭疽病菌のゲノム解析が完了し、その配列情報が利用できるようになった。そこで酵母や他糸状菌における既知のアミノ酸配列を用いて本菌のゲノムに対する BLAST 検索を行い、ホモログ遺伝子を選抜した。

#### (2) 選抜した因子の機能解析

##### 特異的遺伝子破壊株の作出

選抜した個々の遺伝子については塩基配列情報を利用して、2 重交差の相同組み換えによる標的遺伝子破壊ベクターを構築した。ウリ類炭疽病菌の形質転換にはアグロバクテリウム法を用いた。得られた形質転換体については菌糸 PCR 法によるスクリーニングの後、サザンブロット分析により遺伝子破壊の確認を行った。

##### 破壊株の性状解析

得られた破壊株については、寒天培地上におけるコロニー生育能、スライドガラスやセルロース膜上における感染器官形成能、宿主キュウリ、ベンサミアナタバコへの接種による病斑形成能等について、野生株との性状比較を行った。

##### タンパク質の局在解析

選抜した個々の遺伝子を、GFP や RFP 蛍光タンパク質遺伝子の下流や下流に連結させた融合遺伝子コンストラクトを作成した後、アグロバクテリウム法を用いて炭疽病菌に導入した。得られた形質転換体について蛍光顕微鏡観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CoKel2 と相互作用する因子の探索

酵母 Two-hybrid アッセイを利用した新規相互作用因子の選抜の試み

酵母 Two-hybrid アッセイを行うためには CoKel2 の cDNA が必要となる。そこで既存の炭疽病菌の cDNA ライブラリーをテンプレートとした PCR により CoKEL2cDNA の増幅を試みた。しかしながら目的とする cDNA の増幅は認められなかった。また野生株から新たに RNA を抽出し、逆転写したものをテンプレートとして同様の PCR 増幅を試みたが、目的とする cDNA の増幅は認められなかった。

Halo タグによるプルダウンアッセイを利用した新規相互作用因子の選抜の試み

酵母の Two-hybrid 法がうまく利用できなかったことから、その代替法として、プルダウンアッセイ法を利用した実験系の確立を進めた。CoKel2-HaloTag 融合タンパク質発現ベクター pGKO2CoKel2repH1 を構築した。相同組み換えを利用した形質転換により *CoKel2* 遺伝子領域を *CoKel2::HaloTag* 遺伝子に置換した形質転換体 CoKel2 Halo B1 を作出した。今後、HaloTag 結合ビーズを利用したプルダウンアッセイにより、相互作用因子の探索を行う予定である。

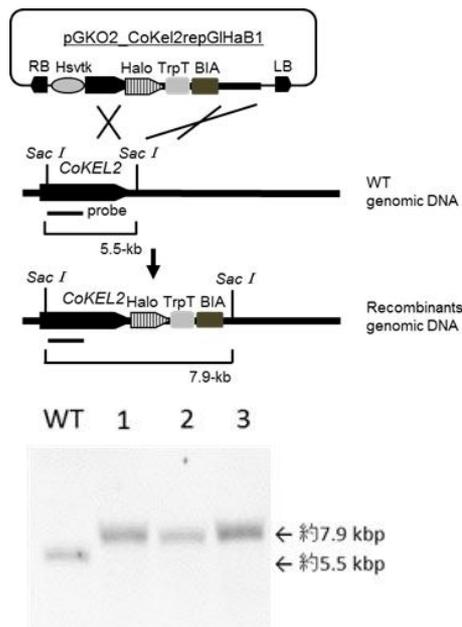


図1 相同組み換えによる *CoKel2::HaloTag* 融合遺伝子発現株の作出

(上) 相同組み換えの模式図、(下) サザンブロット分析による相同組み換えの確認

##### (2) CoBem1、CoKel2 との相互作用が予想され

#### る因子の機能解析

炭疽病菌のゲノム情報を利用した逆遺伝学的アプローチにより、CoBem1、CoKel2 との相互作用が予想される因子の機能解析を行った。

##### Rho 型 G タンパク質 CoCdc42

出芽酵母において足場タンパク質 Bem1 と相互作用する因子の 1 つとして低分子量 G タンパク質 Cdc42 が知られている。そこで、*Cdc42* ホモログ遺伝子をウリ類炭疽病菌より単離して CoCdc42 と命名した。破壊株の性状解析を行ったところ、培地上でのコロニー生育にやや遅延が見られ、また分生子形成量も低下した。宿主キュウリ葉への接種試験の結果、野生株と比較して病斑形成能の低下が認められた。そこで破壊株の感染器官形成能について調べたところ、胞子は長楕円型の異常形態を示し、発芽の遅延や発芽部位の異常が認められた。しかしながら、発芽後は宿主への侵入能を有する付着器を形成した。以上のことから CoCdc42 は細胞極性の制御に必須の因子ではないが、欠損により多面的な異常が生じることが明らかとなった。

##### Rho 型 G タンパク質 CoRac1

糸状菌には Rac1 と呼ばれる、Cdc42 と高い相同性を持つもう一つの Rho 型 G タンパク質が存在することが知られており、その活性酸素生成への関与が示唆されていた。ウリ類炭疽病菌よりホモログを単離して CoRac1 と命名した。破壊株の性状解析の結果、*corac1* 破壊株は培地上コロニー生育の遅延と分生子形成量の低下が見られた。また、形成するコロニーは隆起しており、野生株とは全く異なった表現型であった。感染器官について観察を行ったところ、胞子は球体状の異常形態が観察され、胞子と付着器の接合部位と発芽管・菌糸からは顕著な肥大が認められた。セルロース人工膜への侵入試験、宿主キュウリ葉への接種試験の結果、いずれも付着器形成をするが、侵入菌糸の形成は見られなかった。有傷接種試験においても病斑は見られなかった。以上の結果から、*CoRac1* はウリ類炭疽病菌の細胞分化や病原性など多面的に関与することが明らかとなった。

##### 膜結合タンパク質 CoMod5

分裂酵母において足場タンパク質 Tea1 が膜結合タンパク質 Mod5 と相互依存的に極性制御に関与することが知られている。そこで、*Mod5* ホモログ遺伝子をウリ類炭疽病菌より単離して *CoMod5* と命名した。相同組み換えを利用した形質転換により *comod5* 特異的遺伝子破壊株を作出し、その性状解析を行った。破壊株は *cokel2* 破壊株と同様にコロニー生育にやや遅延が認められたものの、付着器形成や病原性に異常は認められなかった。

##### SH3 ドメインタンパク質 CoTea4

分裂酵母において足場タンパク質 Tea1 と相互作用する因子の 1 つとして SH3 ドメインタンパク質 Tea4 が知られている。そこで、*Tea4* ホモログ遺伝子をウリ類炭疽病菌より単離し

て *CoTea4* と命名した。相同組み換えを利用した形質転換により *cotea4* 特異的遺伝子破壊株および *cotea4::cokel2* 二重破壊株を作出し、それらのセルロース人工基質上およびベンサミアナタバコ上における感染器官観察、キュウリ葉への接種試験を行った。その結果、*cotea4* 破壊株は人工基質上で侵入菌糸を形成せず、側部発芽する異常付着器を形成することがわかった。一方、宿主植物表皮上では正常な付着器を形成し、接種試験により病斑形成も認められた。これらの性状は *cokel2* 破壊株と酷似していた。また、二重破壊株の性状についても調べたところ、*cotea4* および *cokel2* 単独破壊株との顕著な差は認められなかった。

次に CoTea4-RFP 融合タンパク質発現株および CoTea4-RFP 融合タンパク質・CoKel2-GFP 融合タンパク質共発現株を作出し、その孢子および栄養菌糸を蛍光顕微鏡で観察することにより融合タンパク質の局在解析を行った。その結果、野生株において CoTea4-RFP 融合タンパク質の蛍光は極性成長部位である発芽管および栄養菌糸の先端を覆うように局在し、CoKel2-GFP 融合タンパク質のそれと一致した。微小管阻害剤ベノミル処理によりその局在は失われ、細胞質に散在することがわかった。また、*cokel2* 破壊株においても同様に、極性成長端を覆うような局在は失われた。

以上より、CoTea4 が CoKel2 を介した付着器形成制御機構に関与すること、また CoKel2 および微小管依存的に極性成長端に局在することが明らかになった。

最後に、CoTea4 と相互作用する因子の単離を目的として、CoTea4-HaloTag 融合タンパク質発現ベクター pGKG3CoTea4Halo-S6 を構築した。本ベクターを用いて野生株および CoKel2-GFP 発現株の形質転換を行うことにより、CoTea4-HaloTag 発現候補株、CoTea4-HaloTag、CoKel2-GFP 共発現候補株をそれぞれ作出した。今後、得られた形質転換体を用いたブルダウンアッセイにより、CoTea4 と CoKel2 の結合確認を行うとともに、CoTea4 と結合する新規因子の探索を行う予定である。

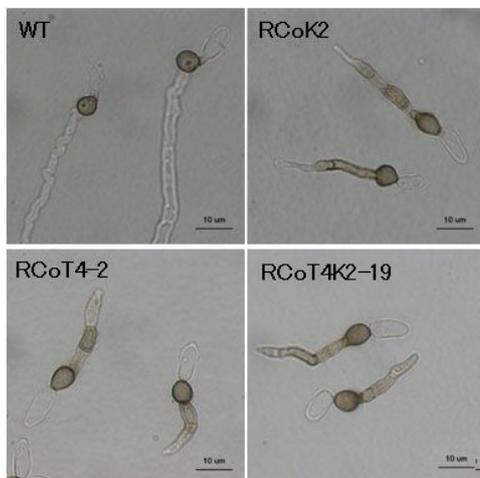


図1 セルロース膜上における感染器官形成  
WT: 野生株、RCoK2: *cokel2* 破壊株、  
RcoT4-2: *cotea4* 破壊株、RcoT4K2: *cokel2::cotea4* 二重破壊株

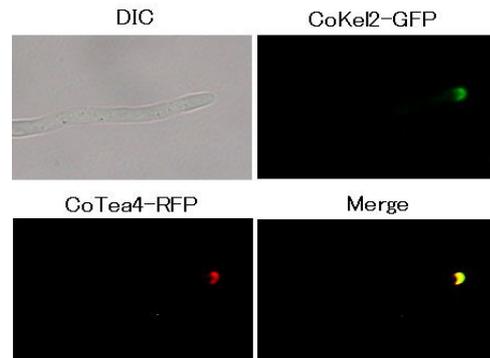


図2 菌糸における CoTea4-RFP 融合タンパク質・CoKel2-GFP 融合タンパク質共発現株の蛍光顕微鏡観察

## 5. 主な発表論文等

(学会発表) (計7件)

- (1) 河下美都里・坂口 歩・久保康之・辻 元人、ウリ類炭疽病菌の推定細胞極性因子 CoTEA4 および CoMOD5 の機能解析、糸状菌分子生物学コンファレンス、2013年11月20、21日、つくば国際会議場(茨城)
- (2) 河下美都里・坂口 歩・久保康之・辻 元人、ウリ類炭疽病菌の CoTEA4 は非生物的シグナルの受容を介した付着器形成に関与する、日本植物病理学会関西支部会、2013年9月26、27日、岡山大学(岡山)
- (3) 幸前有香・河下美都里・久保康之・辻 元人、ウリ類炭疽病菌における NADPH オキシダーゼおよび推定制御因子の機能解析、2013年3月27-29日、日本植物病理学会、岐阜大学(岐阜)
- (4) 河下美都里・幸前有香・野村拓将・久保康之・辻 元人、ウリ類炭疽病菌における低分子量 G タンパク質 CoCdc42、CoRac1 の機能解析、糸状菌分子生物学コンファレンス、2012年11月12-13日、ウインク愛知(愛知)
- (5) 河下美都里・野村拓将・久保康之・辻 元人、ウリ類炭疽病菌における低分子量 G タンパク質 CoCdc42 の機能解析(2012) 日本植物病理学会関西支部会 2012年9月27-28日、とりぎん文化会館(鳥取)
- (6) Takumasa Nomura・Midori Kawashimo・Daigo Takemoto, Yasuyuki Kubo・Gento Tsuji, Investigating the role of deduced polarity establishment factors, CoCDC42 and CoBEM1, in infectious morphogenesis of *Colletotrichum orbiculare*, International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012年7月29日-8月3日、京都国際会議場(京都)
- (7) Takumasa Nomura・Midori Kawashimo・Daigo Takemoto, Yasuyuki Kubo・Gento Tsuji, Investigating the role of deduced

polarity establishment factors during  
infection-related morphogenesis of  
Colletotrichum orbiculare、植物病理学会  
日韓合同シンポジウム、2012年3月27日  
-30日、福岡国際会議場(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 元人(TSUJI GENTO)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号: 50381934

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: