

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450101

研究課題名(和文) 糸状菌の紫外線センシング：紫外線受容体の解明に向けた多面的アプローチ

研究課題名(英文) Multifaceted approaches for elucidation of the ultraviolet receptor for ultraviolet-sensing in phytopathogenic fungi

研究代表者

木原 淳一 (Kihara, Junichi)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40294368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原糸状菌の紫外線センシングに関する紫外線受容体の実体解明に向けた基礎的研究基盤の確立を目的として研究を行なった。イネごま葉枯病菌の近紫外線誘導遺伝子は、青色光受容体と未知の近紫外線受容体によって制御されるグループに大別できることを明らかにした。また、メラニン合成に関するT4HN還元酵素遺伝子を同定し、他のメラニン合成酵素遺伝子と同様に、近紫外線照射による転写制御を受けることが明らかとなった。紫外線LEDを用いた解析から、一部の近紫外線誘導遺伝子と分生孢子形成には、紫外線UVB受容体が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bipolaris oryzae is the causal agent of brown leaf spot disease in rice, and its asexual spore formation is known to be induced by near-ultraviolet (NUV) irradiation. We identified 46 genes up-regulated by NUV irradiation in *B. oryzae*. These genes were categorized as either (1) blue-light receptor (BLR1)-dependent or (2) BLR1-independent expression groups. In addition, we isolated and characterized the T4HR1 gene encoding T4HN reductase in melanin biosynthesis in *B. oryzae*. A quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of T4HR1 transcripts was enhanced by NUV irradiation and regulated by the transcriptional factor BMR1, similar to other melanin biosynthesis genes. On the other hand, analysis using a light emitting diode (LED) that emits ultraviolet radiation suggested that an unknown UVB photoreceptor could participate in the asexual spore formation and in the transcriptional regulation of the genes up-regulated by NUV irradiation in *B. oryzae*.

研究分野：植物病理学・光生物学・糸状菌分子生物学

キーワード：紫外線 光受容体 光形態形成 メラニン 分生孢子形成 遺伝子発現 UVB イネごま葉枯病菌

## 1. 研究開始当初の背景

光合成を行なう植物は、光環境を感知し、自らの生長を制御するため、赤色光受容体(フィトクロム)や青色光受容体(クロプトクロム・フォトトロピン)、紫外線受容体(UVR8)といった光受容体を持つことが知られている。一方、光とは縁がないと考えられてきた糸状菌類(カビ)においても、胞子形成や色素形成といった光形態形成が、青色光や赤色光によって調節される現象が知られており、また、近年のゲノム解析によって、菌類に特有の青色光受容体だけでなく、植物のフィトクロムやクリプトム、そして動物のオプシンに類似した光受容体の存在が糸状菌類で次々明らかになってきた。

一方、申請者は、イネに病気を引き起こすイネごま葉枯病菌の分生胞子形成や黒色色素(メラニン)の合成が、波長 300-400nm の近紫外線照射によって誘導・促進されることを明らかにしてきた。また、これまでに、イネごま葉枯病菌の分生胞子形成の作用スペクトルの解析からも、未知の紫外線受容体の存在が示唆されている。植物では、紫外線受容体 UVR8 がシロイヌナズナで発見されているが、動物や糸状菌類では、これまで紫外線受容体は明らかになっていない。したがって、糸状菌類における未知の紫外線受容体の発見は、紫外線に対する生物の環境適応のメカニズムの解明だけでなく、植物病の防除といった応用にもつながることが期待されている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、イネごま葉枯病菌の紫外線応答(分生胞子形成やメラニン合成系遺伝子発現)に不可欠な紫外線受容体の実体解明を目指すための基礎的研究基盤を確立し、糸状菌類の紫外線センシングに関わる光受容体、及び、イネごま葉枯病菌でみられる特徴的なマイコクローム系の分子基盤の解明に展開するための研究を行なうことを目的とした。

具体的には、一つの大きな柱として、これまでに得られた知見を発展させるため、(1) イネごま葉枯病菌における近紫外線誘導遺伝子の発現様式からみた紫外線受容体の存在の可能性について検討し、また、(2) 近紫外線照射によるメラニン合成増加のメカニズムの全容解明に向けた、メラニン合成系遺伝子の知見をさらに充実させることとした。また、もう一つの柱として、(3) 糸状菌類の紫外線受容体解明に向けて多面的なアプローチから、基礎的研究基盤の確立を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 異なる光受容体によって制御されると考えられる近紫外線誘導遺伝子

暗黒下及び近紫外線を 1 時間照射したコローニから total RNA を抽出し、PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) を用いて、

近紫外線照射によって発現が増加する差次的遺伝子ライブラリを構築し、任意の 46 遺伝子を対象とした。各遺伝子に特異的なプライマーを作成し、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて、リアルタイム PCR による定量 PCR 解析を行なった。対象として GPD 遺伝子を用いた。青色光受容体 BLR1 の関連の有無を確かめるため、野生株及び *BLR1* 遺伝子破壊株を用いて、暗黒下または近紫外線を 1 時間照射した菌体から total RNA を抽出し、cDNA を合成したものを実験に供試した。また、RT-PCR による増幅遺伝子断片を電気泳動によって解析した。

### (2) メラニン合成に関与する *THR2* 遺伝子

上述の 46 遺伝子の中から見出された NUV12 遺伝子を用いて、ORF を含む全長の遺伝子をクローニングし、*THR2* 遺伝子と名付けた。*THR2* 遺伝子破壊株は、ハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカーとして相同置換による遺伝子破壊によって作出した。T3HN 還元酵素を阻害するトリシクラゾールを PDA 培地に添加し、メラニン合成が阻害された時の shunt product の有無を調査した。*THR2* 遺伝子の発現は、*THR2* 遺伝子に特異的なプライマーを作成し、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて、リアルタイム PCR による定量 PCR 解析により行なった。

### (3) 糸状菌の紫外線受容体解明に向けた多面的アプローチ

#### ①ゲノム情報からのアプローチ

シロイヌナズナの紫外線受容体 UVR8 のアミノ酸配列と相同性がある遺伝子をイネごま葉枯病菌のゲノムデータベース (JGI) から検索し、そのひとつを *RCC1* と名付けた。*RCC1* 遺伝子をイネごま葉枯病菌から PCR を用いてクローニングした。*RCC1* 遺伝子破壊株は、ハイグロマイシン耐性遺伝子をマーカーとして相同置換による遺伝子破壊によって作出した。*RCC1* 遺伝子の発現は、*RCC1* 遺伝子に特異的なプライマーを作成し、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて、リアルタイム PCR による定量 PCR 解析により行なった。

#### ②作用スペクトルからのアプローチ

紫外線 UVB(波長ピーク 310nm)と紫外線 UVA(波長ピーク 340nm)を放射する紫外線 LED 照射装置(DOWA エレクトロニクス)を用いて実験を行なった。PDA 培地で 3-4 日間培養したイネごま葉枯病菌の菌叢に紫外線 UVB または紫外線 UVA の LED 光を一定時間照射後、1 日間暗黒下で培養し、形成された分生胞子数を顕微鏡観察によって調査した。また、紫外線 UVB または紫外線 UVA の LED 光を一定時間照射した菌叢から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて、リアルタイム PCR による定量 PCR 解析を行なった。

### ③光受容体からのアプローチ

これまでにクローニングした青色光受容体 (BLR1) 遺伝子に、N 末端または C 末端に FLAG タグ配列に相当する遺伝子配列を挿入し、FLAG タグと青色光受容体の融合タンパク質を発現するベクターを作成した。このベクターと、ジェネティシン耐性遺伝子を含むベクターを、イネごま葉枯病菌のプロトプラストに同時に処理し、形質転換を行なった。

### ④変異体からのアプローチ

イネごま葉枯病菌の分生孢子懸濁液を PDA 培地に塗布後、シャーレの蓋をあけて一定時間、殺菌灯 (波長 254nm) を照射した。その後、暗黒下で数日間培養し、生育してきた菌叢を新しい PDA 培地に 1 個ずつ分離した。分離した菌株の性状を肉眼及び顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 異なる光受容体によって制御されると考えられる近紫外線誘導遺伝子

これまでに、近紫外線照射によって発現が 10~100 倍に増加する 50 以上の新規遺伝子をイネごま葉枯病菌で明らかにしてきた。また、これら遺伝子の一部の遺伝子は、青色光受容体 BLR1 を介して制御されることが示唆されていた。そこで、46 遺伝子に着目し、各遺伝子に特異的なプライマーを作成し、定量 PCR により、野生株と BLR1 遺伝子破壊株における遺伝子発現を調査した。その結果、野生株においては、46 遺伝子すべての発現が近紫外線照射によって増加した。

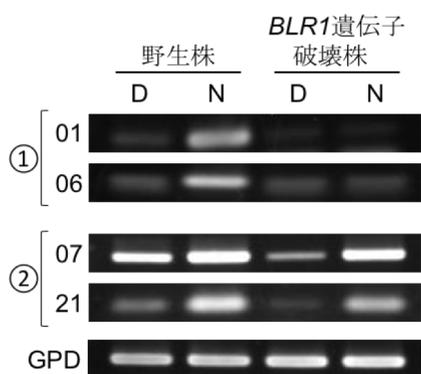


図 1 青色光受容体 BLR1 によって近紫外線照射による発現増加が制御される遺伝子 (D, 暗黒下培養 N, 近紫外線照射)

グループ①は、BLR1 遺伝子破壊株において、野生株で見られる近紫外線照射による遺伝子発現の増加が消失していることから、青色光受容体 BLR1 が関与していると考えられる。一方、グループ②では、野生株と BLR1 遺伝子破壊株ともに近紫外線照射による遺伝子発現の増加が認められ、青色光受容体 BLR1 は関与していないと考えられる。

一方、BLR1 遺伝子破壊株では、一部の遺伝子で、近紫外線照射による遺伝子発現の増加が求められなかったことから (図 1)、これら遺伝子の発現は、青色光受容体 BLR1 によって制御されていると考えられた。よって、近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子は、青色光受容体 BLR1 によって制御されるグループと、未知の近紫外線受容体によって制御されるグループに大別できることが示唆された (雑誌論文①)。

### (2) メラニン合成に関与する THR2 遺伝子

上述の近紫外線照射によって発現が増加する新規遺伝子の中に、メラニン合成系遺伝子と考えられる一つの遺伝子 (NUV12) が見出された。これまでに、イネごま葉枯病菌では、メラニン合成に関与するポリケチド合成酵素遺伝子 (PKS1)、シタロン脱水酵素遺伝子 (SCD1)、1,3,8-トリヒドロキシナフタレン (T3HN) 還元酵素遺伝子 (THR1) の発現が近紫外線照射によって特異的に増加することが明らかとなっている。そこで、NUV12 の機能解析及び発現解析を行なった。NUV12 の遺伝子の全長をクローニングし、相同性検索を行なった結果、1,3,6,8-トリヒドロキシナフタレン (T4HN) 還元酵素遺伝子と高い相同性があったことから、本遺伝子を THR2 遺伝子と名付けた。THR2 遺伝子破壊株は、通常の培地では、野生株と同様にメラニンを合成したが、興味深いことに、T3HN 還元酵素を阻害するトリシクラゾールを添加した場合、野生株と比較して、鮮やかな赤い色素を蓄積した (図 2)。以上の結果から、THR2 遺伝子が T4HN 還元酵素をコードしていることが示唆された。また、THR2 遺伝子の発現は、他のメラニン合成酵素遺伝子 (PKS1、SCD1、THR1) と同様に近紫外線照射によって増加し、転写制御因子 (BMR1) の転写制御を受けることが明らかとなった (雑誌論文②)。

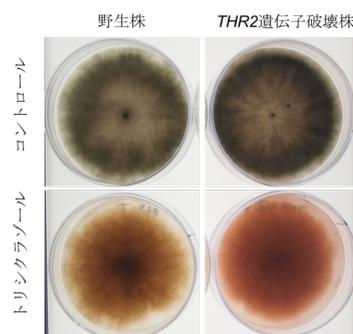


図 2 トリシクラゾール存在下における THR2 遺伝子破壊株の shunt product の蓄積

コントロールでは、野生株と THR2 遺伝子破壊株に差異は認められないが、トリシクラゾール存在下では、THR2 遺伝子破壊株で赤い色素 = shunt product の蓄積が認められる。

### (3) 糸状菌の紫外線受容体解明に向けた多面的アプローチ

#### ①ゲノム情報からのアプローチ

植物(シロイヌナズナ)では、紫外線受容体(UVR8)が明らかになっている。そこで、UVR8のアミノ酸配列と相同性が認められる遺伝子をイネごま葉枯病菌のゲノムデータベース(JGI)を用いて検索し、候補遺伝子(RCC1)をイネごま葉枯病菌からクローニングした。RCC1遺伝子の発現には、近紫外線照射の影響は認められず、また、RCC1遺伝子破壊株の性状も野生株と同じであったことから、RCC1遺伝子は紫外線受容体をコードしていないと考えられた。

#### ②作用スペクトルからのアプローチ

これまで実験に用いてきたBLB蛍光灯は、近紫外線(波長300-400nm)を放射し、紫外線受容体の特徴をとらえる上では不都合があった。そこで、紫外線UVB(波長ピーク310nm)と紫外線UVA(波長ピーク340nm)を放射する紫外線LED照射装置を作成し、分生孢子形成を調査した結果、紫外線UVBによる孢子形成誘導効果が高かったことから、イネごま葉枯病菌の分生孢子形成には、未知の紫外線UVB受容体が関与していることが示唆された。一方、遺伝子発現においては、遺伝子によって、紫外線UVBと紫外線UVAの効果は様々であった。紫外線UVAは、青色光受容体BLR1の吸収スペクトルと重なる部分があることから、紫外線UVAによって発現が増加する遺伝子は、青色光受容体BLR1が関与していることが推察された。

#### ③光受容体からのアプローチ

はじめに、イネごま葉枯病菌で明らかになっている青色光受容体BLR1遺伝子に、FLAGタグ配列を挿入したベクターを作成し、イネごま葉枯病菌BLR1遺伝子破壊株への形質転換を試みたが、うまくいかなかった。これまでに、イネごま葉枯病菌の形質転換効率は非常に低いことが明らかになっており、今後、形質転換効率の良い他の糸状菌で実験系を構築し、光受容体を解析していく必要があると考えられた。

#### ④変異体からのアプローチ

紫外線による光形態形成の変異体を作成する方法の検討を行なった。寒天培地上にイネごま葉枯病菌の分生孢子を塗布し、照射時間や照射強度を変えた条件で殺菌灯を照射後、生育してきたコロニーを分離し、その性状を解析した。寒天培地上で生育遅延や菌糸の異常生長を示す変異株が得られたが、その性質は不安定であり、分離菌の多くは、継代培養できなかった。また、イネごま葉枯病菌はひとつの細胞に核が複数個あり(多核)、このことが変異体の作出を困難にしている理由ではないかと考えられた。

### 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 Tanaka N, Haruki Y, Ueno M, Arase S, and Kihara J. (2015) Expression analysis of *T4HRI*, a 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene reductase gene involved in melanin biosynthesis, is enhanced by near-ultraviolet irradiation in *Bipolaris oryzae*. *Advances in Microbiology* 5: 166-176. 査読有.  
<http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.53016>

② Kihara J, Tanaka N, Ueno M, and Arase S (2014) Identification and expression analysis of regulatory genes induced by near-ultraviolet irradiation in *Bipolaris oryzae*. *Advances in Microbiology* 4: 233-241. 査読有.  
<http://dx.doi.org/10.4236/aim.2014.45030>

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://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・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：