

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450059

研究課題名(和文)植物病原菌類におけるホメオボックス遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of homeobox gene in plant pathogenic fungi

研究代表者

鈴木 一実 (Suzuki, Kazumi)

滋賀県立大学・環境科学部・教授

研究者番号：90390880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウリ科植物に炭疽病を引き起こすウリ類炭疽病菌のゲノム情報を解析したところ、本菌は10個のホメオボックス遺伝子を有することが明らかとなった。これらの10個のホメオボックス遺伝子のうち、5個のホメオボックス遺伝子では相同性組み換えによる遺伝子破壊株の作出と表現型の解析により、機能が推定できた。これらの5種類の解析したホメオボックス遺伝子はそれぞれウリ類炭疽病菌の感染過程で異なる機能を有していること、いずれも病原性関連遺伝子として本菌の病原性発現に重要な役割を果たしていることが明らかとされた。

研究成果の概要(英文)：Genome analysis revealed that the plant pathogenic fungus, *Colletotrichum orbiculare*, causal agent of cucumber anthracnose, has conserved 10 homeobox genes. Among these 10 homeobox genes, 5 genes were disrupted using homologous recombination and the function of each homeobox gene was estimated through phenotypic analysis. Results clearly show that 5 homeobox genes are involved in different morphogenetic process during plant infection and that these genes play important roles in pathogenicity of this fungus as pathogenicity related genes.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 ホメオボックス遺伝子 病原性発現 付着器形成 付着器侵入 遺伝子破壊 バイオトロフィー ネクロトロフィー

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物病原菌類は植物病害の病原体の約 8 割を占めるといわれている。農業現場での菌類による病害の防除には多くの農業用殺菌剤が処理されている。有効な薬剤も知られているが、薬剤の連用により薬剤耐性菌が出現し、薬剤の防除効果が十分に発揮されない事例も報告されている。また、薬剤の安全性、自然生態系への影響を考慮して、薬剤のみに頼らず、病原菌の感染・発病機構を逆手にとって、効率よく病害を防除する手段やシステムの開発も強く求められている。

(2) 植物病原菌類の病原性発現機構(病原菌はどのようにして宿主植物に感染して発病を引き起こすのか)の解明は植物病害における新しい防除法や環境負荷のより小さい新規殺菌剤の開発につながると考えられる。植物病原菌類の病原性発現機構の解析には、病原菌がもつ病原性発現に関与している「病原性関連遺伝子」の単離および同定が重要である。病原性発現に関与している新規な病原性関連遺伝子が解明できれば、その遺伝子産物の機能を阻害する化合物の選抜といった新しい農薬の創生につながる基礎的な実験系を構築することが可能となる。

(3) 植物病原菌類の病原性発現機構の解析から得られた研究成果として、ウリ類炭疽病菌やイネいもち病菌を材料として、これまでに多くの病原性関連遺伝子が同定されてきた。とくに、メラニン合成に関与する遺伝子の同定および機能解析から得られた、付着器のメラニン化が病原性発現に重要であるとの知見は、殺菌剤の新しいターゲットとしての付着器のメラニン化の重要性を明確に示したものである。現在、イネの最重要病害であるいもち病の防除ではメラニン合成阻害を作用機作とする薬剤が幅広く使用されている。

(4) これまでに、私たちは AtMT (*Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation) 法を用いたウリ類炭疽病菌 104-T 株のランダム突然変異誘導試験を行い、Path-1 ~ Path-14 の計 14 菌株の病原性欠損変異株を選抜した。このうち Path-9 株ではホメオボックスドメインを有する遺伝子 (*CoHox1*) が破壊されていることを明らかとしてきた。とくに興味深いことに、Path-9 株および *CoHox1* 遺伝子破壊株は人工セルロース膜には侵入できるものの、宿主植物への侵入能力を欠損していることから、*CoHox1* 遺伝子は宿主特異的な病原性関連遺伝子と位置づけられる。

2. 研究の目的

(1) ホメオボックス遺伝子は、ショウジョウバエにおいて触角や足などの大規模な形態形成に関与することが知られている、遺伝

子発現の重要な制御因子である。ホメオボックス転写因子は動物に限らず、植物や菌類でも保持されており、発生の調節を行い、DNA に結合して遺伝子の転写を制御する働きを持つ。植物病原菌におけるホメオボックス遺伝子の機能解析に関する研究例は少なく、病原性発現における役割あるいは各ホメオボックス遺伝子の機能分化については不明な点が多い。また、ホメオボックス転写因子と相互作用するターゲット遺伝子の同定、ホメオボックス転写因子を含む細胞内シグナル伝達機構の解明も非常に興味ある研究課題である。

(2) これまでに、ウリ類炭疽病菌においてホメオボックス遺伝子 *CoHox1* が宿主植物への病原性発現に必須であることを見出した。本研究では、ウリ類炭疽病菌における *CoHox1* および他のホメオボックス遺伝子の病原性および形態分化に対する機能を詳細に評価する。さらに、他種の植物病原菌類における *Hox1* ホモログ遺伝子の機能についても解析し、植物病原菌類のホメオボックス遺伝子の病原性発現における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 研究開始初年度である平成 26 年度には、相同性組換えによって得られたウリ類炭疽病菌の *CoHox1* 遺伝子破壊株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の表現型(培地上での菌そう生育および孢子形成、分生孢子形態分化、宿主キュウリ葉に対する病原性、宿主植物上での形態分化)を詳細に解析した。あわせて、ホメオボックス転写因子の細胞内局在部位の解析を行うため、*CoHox1* 遺伝子破壊株に *CoHox1-GFP* 融合遺伝子を導入し、相補株を作成した。蛍光顕微鏡で *CoHox1* 遺伝子産物の細胞内局在の観察を行った。

(2) 平成 27 年度以降はウリ類炭疽病菌の他のホメオボックス遺伝子の同定および機能解析を行った。あわせて、他の農業上重要な植物病原菌(トウモロコシごま葉枯病菌など)におけるホメオボックス遺伝子の機能解析にも取り組んだ。また、ホメオボックス遺伝子と相互作用する遺伝子を検索するために、*CoHox1* 遺伝子および *CoHox3* 遺伝子に焦点をあて、付着器形成時や侵入菌糸で特異的に発現するいくつかの遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質を付加したベクターを *CoHox1* 遺伝子破壊株および *CoHox3* 遺伝子破壊株に導入し、蛍光の検出を実施した。

4. 研究成果

(1) ウリ類炭疽病菌のゲノム情報を解析したところ、本菌は *CoHox1* 以外に 9 個のホメオボックス遺伝子を有することが明らかとなった。これらの 10 個のホメオボックス遺伝子のうち、5 個のホメオボックス遺伝子では遺伝子破壊株の作出と表現型の解析によ

り、機能が推定できた。

(2) *CoHox1* および *CoHox3* 遺伝子についてはそれぞれの遺伝子破壊株の表現型の解析を行ったところ、*CoHox1* 遺伝子は侵入菌糸の形態分化に、*CoHox3* 遺伝子は付着器の形態分化に参与していることが明らかとなった。また、*CoHox10* 遺伝子はすでに先行研究で付着器貫入に参与していることが報告されている *CST1(Ste12)* 遺伝子であることが判明した。さらに、*CoHox2* 遺伝子および *CoHox4* 遺伝子破壊株を作出し表現型を解析したところ、*CoHox2* 遺伝子は分生孢子形成に、*CoHox4* 遺伝子は栄養菌糸生育、分生孢子的形態および付着器の形成に参与することが明らかとなった。一方、*CoHox6* 遺伝子および *CoHox7* 遺伝子破壊株では野生株と比較して表現型に差異は認められなかった。

(3) これらのことから、ウリ類炭疽病菌が有する 10 個のホメオボックス遺伝子のうち、少なくとも 5 種類の解析した遺伝子はそれぞれ感染過程で異なる機能を有していること、いずれも病原性関連遺伝子として本菌の病原性発現に重要な役割を果たしていることが明らかとされた。また機能が未解明の 3 個の遺伝子についても、現在遺伝子破壊ベクターの構築と遺伝子破壊株の作出を実施中である。

(4) また、農業上重要な植物病原菌であるトウモロコシごま葉枯病菌も 10 個のホメオボックス遺伝子を有していることがゲノム解析から明らかとなった。トウモロコシごま葉枯病菌のこれらのホメオボックス遺伝子についてはすべての遺伝子破壊株が得られ、表現型の解析を実施中である。

(5) 本研究の成果として、これまで十分に明らかにされていなかった、植物病原菌におけるホメオボックス転写因子の機能や病原性発現における役割が明らかとされた。さらに、今後の研究の進展により、ホメオボックス転写因子を含む細胞内シグナル伝達機構が解明されることが期待される。これらの新しい知見は植物病害における新しい防除法や殺菌剤の開発を進める上で重要で有益な知見を提供するものと考えられる。

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 1 件)

— 鈴木一実、横山 綾、多々良康香、谷口拓矢、小松 香、加藤春奈、丹羽日朗、入江俊一、泉津弘佑、ウリ類炭疽病菌における病原性関連遺伝子の機能解析、植物感染生理談話会論文集、査読無、49 巻、2014、11-19

〔学会発表〕(計 8 件)

小幡善也、横山 綾、泉津弘佑、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌のホメオボックス転写因子 *CoHox4* は栄養菌糸生育、分生孢子的形態、付着器形成および病原性に参与する、平成 29 年度日本植物病理学会大会、2017 年 4 月 26 日～28 日、アイーナ(岩手県・盛岡市)

小幡善也、横山 綾、泉津弘佑、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写因子 *CoHox2* の機能解析、平成 28 年度日本植物病理学会関西部会、2016 年 9 月 29 日～9 月 30 日、静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ(静岡県・静岡市)

小幡善也、横山 綾、泉津弘佑、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌においてホメオボックス転写因子 *CoHox2* は分生孢子形成および剛毛形成に参与する、平成 28 年度植物感染生理談話会、2016 年 8 月 10 日～8 月 12 日、シーパル須磨(兵庫県・神戸市)

横山 綾、泉津弘佑、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写因子と病原性との関連、平成 28 年度植物感染生理談話会、2016 年 8 月 10 日～8 月 12 日、シーパル須磨(兵庫県・神戸市)

横山 綾、泉津弘佑、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌のホメオボックス転写因子 *CoHox3* の付着形成における役割、平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016 年 3 月 21 日～3 月 23 日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

横山 綾、泉津弘佑、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写因子 *CoHox3* の機能解析、平成 26 年度日本植物病理学会関西部会、2014 年 9 月 27 日～9 月 28 日、富山大学(富山県・富山市)

鈴木一実、横山 綾、多々良康香、谷口拓矢、小松 香、加藤春奈、丹羽日朗、入江俊一、泉津弘佑、ウリ類炭疽病菌における病原性関連遺伝子の機能解析、平成 26 年度植物感染生理談話会、2014 年 8 月 6 日～8 月 8 日、作並温泉(宮城県・仙台市)

横山 綾、泉津弘佑、谷口拓矢、多々良康香、小玉紗代、入江俊一、鈴木一実、ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写因子 *CoHox1* の機能解析、平成 26 年度日本植物病理学会大会、2014 年 6 月 2

日～6月4日，札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ses.usp.ac.jp/shigen/staff/stf_suzuki.html

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 一実（SUZUKI, Kazumi）
滋賀県立大学・環境科学部・教授
研究者番号：90390880

(2)研究分担者

泉津 弘佑（IZUMITSU, Kosuke）
滋賀県立大学・環境科学部・助教
研究者番号：20579263

(3)研究協力者

横山 綾（YOKOYAMA, Aya）
小幡 善也（OBATA, Yoshiya）