

植物病原糸状菌の遺伝子解析

京都府立大学農学部植物病理学研究室 久保 康之

はじめに

従来、植物病原糸状菌の病原性に関する主要な知見は生理学、細胞学的分析により得られてきた。近年、植物病原糸状菌の形質転換法の確立により植物病原糸状菌の遺伝子分析法として遺伝子相補、遺伝子タグ法、逆遺伝学法などの研究手法の適用が可能となった。こうした手法を駆使し、形態分化関連遺伝子、感染特異性決定遺伝子など、広く病原性に関与する遺伝子の単離と機能解析が進展している。ここでは、植物病原糸状菌の遺伝子解析の研究動向として、広義の病原性関連遺伝子に関する最近の研究成果を紹介する。

I 付着器分化関連遺伝子

多くの植物病原菌は、侵入器官として付着器を形成する。とくにいもち病菌 (*Magnaporthe* 属菌)、炭そ病菌 (*Colletotrichum* 属菌) は形態的に発達した付着器の分化を行うことから、広範な生理、生化学的解析が行われてきた。近年、付着器分化に関与する遺伝子が相次いでクローニングされ、付着器形成機構解明の新展開が見られている。イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) の付着器形成には接触刺激が関与し、親水性を異にする人工基質を用いた付着器形成実験から発芽胞子下の疎水性が付着器形成を誘導し、cAMP 添加および阻害剤実験からその信号伝達には cAMP 依存の信号伝達系が関与していることが推定された (LEE and DEAN, 1993)。次いで、cAMP 依存タンパク質キナーゼ cpkA が単離され、遺伝子置換実験から cPKA を欠落した形質転換株の付着器形成が疎水面上でも行われないことから、cAMP 依存タンパク質キナーゼの付着器形成への関与が確認された (MITCHELL and DEAN, 1995)。また、cpkA 欠損株は培地上では正常に生育するが、イネに病原性を示さない。これは一つには付着器形成ができず、侵入能を欠いているためであるが、加えて傷接種によって接種した場合においても病原性を示さず、cpkA は宿主感染時に何らかの機能を果たしていると考えられている。また最近、MAP キナーゼが付着器形成に関与していることが

報告された。酵母のフェロモン信号伝達に関与する MAP キナーゼ *FUS3*, *KSS1* のホモログ *PMK1* が *M. grisea* から単離され、遺伝子置換実験から *PMK1* 欠損形質転換株が付着器形成能を欠失していること、また *PMK1* 遺伝子がイネ上での菌の生育、病徴発現に関与していることが示された (XU and HAMER, 1996)。 *PMK1* 欠損株は cAMP に対する反応性を保持しており、cAMP 信号伝達系の下流に位置するものと考えられている。付着器形成に関与する遺伝子としてはディファレンシアルスクリーニング法により感染時発現特異的遺伝子として *MPG1* が報告されている。 *MPG1* は疎水性タンパク質ハイドロフォビンをコードしており、胞子表面に疎水性を与えることにより胞子下の疎水面との相互作用をもたらし、これが付着器形成誘導のセンサーの働きをすると想定されている (TALBOT et al., 1995)。 *MPG1* 欠損形質転換株は、付着器形成能と宿主に対する病原性を失う。炭そ病菌においては、アボカド炭そ病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) の付着器形成胞子のサブトラクティブ cDNA ライブラリーから、付着器形成時特異的発現遺伝子の同定が行われている (HWANG and KOLATTUKUDY, 1995)。このなかで発現産物が付着器細胞壁に局在化する遺伝子や、遺伝子破壊実験から病原性に関与している遺伝子が明らかにされているが、その機能は明らかではない。ウリ類炭そ病菌 (*Colletotrichum lagenarium*) においては、ディファレンシアルスクリーニング法により発芽胞子特異的発現遺伝子の同定を行っている (KURODA et al., 1996)。

II メラニン合成系遺伝子

いもち病菌 (*Magnaporthe* 属菌)、炭そ病菌 (*Colletotrichum* 属菌) などメラニン化した付着器を形成する糸状菌では、メラニン合成が付着器からの侵入に必須の代謝系である。これらの菌の生産するメラニンは、ペンタケタイド由来の 1, 8-ジヒドロオキシナフタレンの重合産物であり、突然変異株、および阻害剤を用いた広範な実験から、その合成系路が明らかにされている。 *C. lagenarium* ではメラニン合成に関与する主要な 3 種の酵素、すなわちポリケタイド合成酵素 (TAKANO et al., 1995)、サイタロン脱水酵素 (KUBO et al., 1996)、トリハイドロオキシナフタレン還元酵素 (PERPETUA et al.,

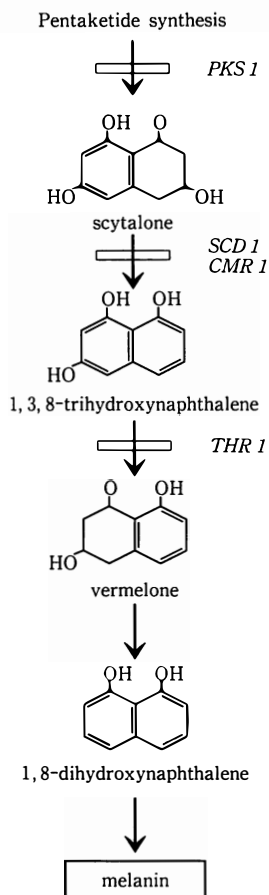


図-1 ウリ類炭そ病菌のメラニン合成経路と単離された遺伝子

1996) をコードする遺伝子 (*PKS1*, *SCD1*, *THR1*), およびサイタロン脱水酵素発現に関与しているとみられるメラニン合成制御遺伝子 (*CMR1*) (剣持, 1997) のクローニングと構造解析がなされている (図-1)。RNA プロット分析により, 付着器分化過程においてこれらメラニン合成酵素遺伝子は, 胞子発芽初期に転写されることが明らかにされており, 発芽時における転写制御系の関与が想定される。一方, 酵素活性は付着器の分化時に増高することから, 何らかの転写後の制御の関与が想定されていたが, これらメラニン合成酵素に対する抗体を用いた免疫プロット分析から, さらに翻訳後の制御機構の関与の可能性が示唆されている (辻, 1997)。これら一連の結果は, メラニン合成が付着器の分化過程において, 極めて巧妙に制御されていることを示している。トリシクラゾール, フサライドなどのメラニン合成抗もち剤は, トリハイドロオキナフタレン還元反応を阻害す

る。また近年, 開発された新規抗もち剤, カルプロバミドはサイタロン脱水反応を阻害すると想定されていたが, *C. lagenarium* の組換えサイタロン脱水酵素を用いた *in vitro* 反応系で本剤がサイタロン脱水酵素を標的とし, 直接反応を阻害することが明らかになっている (TSUJI et al., 1996)。また, *M. grisea* においては組換えサイタロン脱水酵素の純化と結晶化による三次元構造の解析が行われ, 阻害活性をもつ薬剤の作用モデルが提示されている (LUNDQVIST et al., 1994)。*M. grisea* ではその他, テトラハイドロオキシナフタレン還元酵素の純化および遺伝子のクローニングがなされている (VIDAL-CROS et al., 1994)。メラニン合成が付着器侵入に必須である病原糸状菌は *Magnaporthe* 属菌, *Colletotrichum* 属菌のみ知られているが, ジハイドロオキシナフタレンを重合単位とするメラニンは子囊菌類一般に広く認められる。ナシ黒斑病菌 (*Alternaria alternata*) において早くからメラニン合成酵素をコードする遺伝子のクラスターが単離され (KIMURA and TSUGE, 1993), 他の菌におけるメラニン合成遺伝子解析の基礎となっている。同様の遺伝子クラスターはトウモロコシごま葉枯病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*), イネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) においても報告されている。一方, *Magnaporthe* 属菌, *Colletotrichum* 属菌においてメラニン合成系遺伝子はクラスターを形成していない (KUBO, et al., 1996)。

III 交配型遺伝子

トウモロコシ黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) では, 半数性の酵母状生育をする細胞の融合によって生じる, 2核性の菌糸のみが宿主への感染能を有する。細胞の融合と病原性の発現には, *a* と *b* の交配型遺伝子座が関与している。*a* 座位はフェロモンによる認識システムに関与する構造遺伝子をコードしており, 2種の対立遺伝子はそれぞれフェロモン前駆体とフェロモン受容体をコードしている (URBAN et al., 1996)。フェロモンシグナルはMAP キナーゼカスケードによって伝達され, *a* 座, *b* 座の遺伝子の発現の増高を導くと考えられている (BAUNETT and HERSKOWITZ, 1994)。一方, 複対立遺伝子座である *b* 座位は *bE* と *bW* ホメオドメインタンパク質をコードし, 異なる対立遺伝子の *bE*, *bW* 遺伝子産物のみがヘテロ2量体を形成し, 細胞内での認識を行う。このヘテロ2量体は転写因子と考えられており, 生殖過程の進行, および病原性発現に関与する遺伝子の発現を誘導する (KAHMANN et al., 1995)。また, 宿主上での2核性菌糸の生育維持には, *a* 座と *b* 座の両遺伝子が関与し

ている。ヘテロタリックの子囊菌である *C. heterostrophus* では、単一の交配型遺伝子座位における2種の遺伝子 *MAT-1* と *MAT-2* がクローニングされている (TURGEON et al., 1993)。コードされる推定タンパク質は *Neurospora crassa* や *Podospora anserina* の交配型遺伝子と相同性を有しており、これらの遺伝子がコードするタンパク質がDNA結合タンパク質であることから、類似の転写制御機能を有することが想定されている。同様に *M. grisea* においても、交配型遺伝子 *Mat1-1* と *Mat1-2* がクローニングされている (KANG et al., 1994)。

IV 細胞壁分解酵素遺伝子

細胞壁分解酵素は病原菌の侵入、進展および栄養獲得のために重要な機能を果たしていると考えられる。細胞壁分解酵素には基質、また反応性を異にする多様な酵素が含まれるが、これら酵素をコードする遺伝子の単離により、感染場面における酵素の意義説明が試みられている。クチナーゼ遺伝子は *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Magnaporthe* 属菌などで単離され、構造解析とともに遺伝子破壊法により病原菌感染時のクチナーゼの意義が図られた。遺伝子破壊株の接種実験から、*Fusarium solani* においてはクチナーゼが病原性に直接関連しないという結果 (STAHL and SCHAFER, 1992) と、病原性が低下する (KOLATTUKUDY et al., 1995) という相反する結果が異なる研究者から提示され、*M. grisea* では病原性に直接関連しないという結果が得られている (SWEIGARD et al., 1992)。 *Cochliobolus carbonum* ではエンドポリガラクトソナーゼ、キシラナーゼ、グルカナーゼ、セルラーゼなどの細胞壁分解酵素遺伝子を単離し、遺伝子破壊実験によりそれぞれの酵素の機能評価を行っているが、個々の遺伝子単独の遺伝子破壊実験では病原性に顕著な影響は認められないという結果が得られている (APEL-BIRKHOLD and WALTON, 1996)。これらの酵素は相加的に効果をもたらし、単独の欠損ではその変化が認められない可能性が考えられる。また、これらの実験結果は必ずしも圃場、あるいはフィールドでの意義を評価するものではないことを考慮しなければならない。

V 宿主特異的毒素合成遺伝子

C. carbonum レース1は宿主特異的毒素 HC-toxin を生産する。HC-toxin 還元酵素をコードする *Hm* 遺伝子が劣性ホモのトウモロコシ系統はレース1に対して高い罹病性を示す。HC-toxin は環状テトラペプチドであり、その合成には HC-toxin 合成酵素 (HTS) が関

与し、HTS をコードする遺伝子 *HTS1* は 570 kDa のタンパク質をコードしている。また、このタンパク質は4種の相同領域を構成し、アミノ酸の活性化と異性化だけでなく、ペプチドの結合と環状化に関与しているとみられている (SCOTT-CRAIG et al., 1992)。HC-toxin 生産株はゲノム中に *HTS1* 遺伝子を通例2コピー有し、HC-toxin 非生産株は *HTS1* の両コピーを欠いている。毒素生産には *HTS1* 以外に *TOXA*, *TOXC*, *TOXD* の関与が知られている。*TOXA* は抗生物質の輸送ポンプに類似の膜タンパク質をコードするとみられ、HC-toxin に対する自己耐性に寄与していると想定されている (PITKIN et al., 1996)。また、*TOXC* は脂肪酸合成酵素のベータサブユニットと高い相同性を有し、HC-toxin を構成する2-アミノ-9,10-エポキシ-8-デカノイック酸のデカノイック酸骨格の合成に関与しているとみられている。*TOXD* についてはその機能は明らかではない。さらに、これら遺伝子のゲノム上での配置について詳細な検討がなされている (AHN and WALTON, 1996)。*C. heterostrophus* レースTはポリケタイドのT-toxinを生産し、T細胞質を有するトウモロコシ系統はレースTに高い罹病性を示す。T-toxin 合成に関与するポリケタイド合成酵素がREMI法(制限酵素存在下で菌の形質転換を行い、プラスミドによる挿入変異株を得る遺伝子タギング法)によりタグされ、構造解析が進められている (Lu et al., 1994)。

VI 非病原性因子

これまでに3種のレース特異的エリシターが単離されている。オオムギ雲形病の病原菌である *Rhynchosporium secalis* の生産するレース特異的タンパク質エリシターNIPは82アミノ酸残基からなり、PRタンパク質であるPR *Hv-1* の蓄積を誘導する (ROHE et al., 1995)。AVR4とAVR9はトマト葉かび病菌 (*Cladosporium fulvum*) の生産するレース特異的タンパク質エリシターであり、それぞれ *Cf-4* と *Cf-9* 抵抗性遺伝子をもつトマト品種に過敏反応を誘起する。AVR9タンパク質は28アミノ酸残基からなり、タンパク質の二次構造解析からセリンプロテアーゼインヒビター (CPI)、イオンチャンネルブロッカー (KalataB1)、成長因子などとの構造的類似性が明らかにされている。また、トマト植物葉からのAVR9タンパク質のレセプターの分離が試みられている。現在、*Cf-9* 抵抗性遺伝子を保有するトマト品種と保有しない品種の両者から特異的結合膜画分が得られており、過敏反応誘起の特異性決定機構の解明が期待される (KOOMAN-GERSMANN et al., 1996)。

AVR9タンパク質は *Cf-9* ホモログを有するナス科植物と結合活性を有するが、他の植物との結合能を有しない。AVR4タンパク質は135アミノ酸残基からなり、*Cf-4* 抵抗性遺伝子保有品種に対して抵抗性反応を誘導する。また、病原性系統は *Avr4* 遺伝子のコード領域でシステインがチロシンに変化する点突然変異を有していることが報告されている (Joosten et al., 1994)。*M. grisea* においては、ウィーピングラブグラスに対する非病原性を決定づけている遺伝子 *PWL2* が交配試験により同定され、遺伝子マップに基づいて遺伝子の単離に成功している (Sweigard et al., 1995)。*PWL2* はグリシンに富む親水性のタンパク質をコードし、この遺伝子を有する *M. grisea* 菌系はウィーピングラブグラスに対する病原性を失う。*PWL2* のホモログも数種同定されており、特異性決定機構の解明が期待される。

お わ り に

病原糸状菌の病原性関連遺伝子に焦点をあて、分子遺伝学的研究の最近の話題を紹介してきた。糸状菌の遺伝子研究はその他、トランスポゾン、ゲノム分析、分子系統分類等、多角的研究が展開されている。実験微生物である酵母ではゲノムシークエンスプロジェクトの推進により、全ゲノムシークエンスが明らかにされている。一方、糸状菌の実験微生物である *Neurospora crassa* や *Aspergillus nidulans* においても、同種プロジェクトの具体化が指向されている。病原糸状菌の遺伝子研究はこうした成果を背景に、今後、なお一層の進展が期待される。また、同時に病原性遺伝子など病原菌に特異的な遺伝子の研究には、いもち病菌など重要病原糸状菌のゲノムシークエンスプロジェクトの推進が必要になってくると思われる。アメリカにおいてはすでに具体的検討段階に入っていると聞いている。後塵を拝することのない研究の推進を期したい。

引 用 文 献

- 1) AHN, J. H. and J. D. WALTON (1996): Plant Cell 8: 887~897.
- 2) APEL-BIRKHOFF, P. C. and J. D. WALTON (1996): Appl. Environment. Microbiol. 62: 4129~4135.
- 3) BAUNETT, F. and I. HERSKOWITZ (1994): Genes Dev. 8: 1367~1378.
- 4) HWANG, C. S. and P. E. KOLATTUKUDY (1995): Mol. Gen. Genet. 247: 282~294.
- 5) JOOSTEN, M. H. et al. (1994): Nature 367: 384~386.
- 6) KAHMANN, R. et al. (1995): Curr. Opinion in Genet. and Dev. 5: 559~564.
- 7) KANG, S. et al. (1994): Genetics 138: 289~296.
- 8) 剣持有希 (1997): 京都府立大学農学部 植物病理学研究室 卒業論文
- 9) KIMURA, N. and T. TSUGE (1993): J. Bacteriol. 175: 4427~4435.
- 10) KOLATTUKUDY, P. E. et al. (1995): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4080~4087.
- 11) KOOMAN-GERSMANN, M. et al. (1996): Plant Cell 8: 929~938.
- 12) KUBO, Y. (1996): Molecular Aspects of Pathogenicity and Resistance: Requirement for Signal Transduction. APS Press, St. Paul Minnesota. pp. 73~82.
- 13) ——— et al. (1996): Appl. Environment. Microbiol. 62: 4340~4344.
- 14) KURODA, I. et al. (1996): 8-th International Congress Mol Plant Microbe. Interact. Knoxville Abstract J-24.
- 15) LEE, Y. H. and R. A. DEAN (1993): Plant Cell 5: 693~700.
- 16) LU, S. et al. (1994): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12649~12653.
- 17) LUNDQVIST, T. et al. (1994): Structure 2: 937~944.
- 18) MITCHELL, T. K. and R. A. DEAN (1995): Plant Cell 7: 1869~1878.
- 19) PERPETUA, N. S. et al. (1996): Mol. Gen. Genet. 9: 323~329.
- 20) PITKIN, J. W. et al. (1996): Microbiology 142: 1557~1565.
- 21) ROHE, M. et al. (1995): EMBO J. 14: 4168~4177.
- 22) SCOTT-CRAIG, J. S. et al. (1992): J. Biol. Chem. 67: 26044~26049.
- 23) STAHL, D. J. and W. SCHAFER (1992): Plant Cell 4: 621~629.
- 24) SWEIGARD, J. A. et al. (1992): Mol. Gen. Genet. 232: 183~190.
- 25) ——— et al. (1995): Plant Cell 7: 1221~1233.
- 26) TAKANO, Y. et al. (1995): Mol. Gen. Genet. 249: 162~167.
- 27) TALBOT, N. et al. (1995): Plant Cell 8: 985~999.
- 28) TSUJI, G. et al. (1996): 8-th International Congress Mol Plant Microbe. Interact. Knoxville Abstract J-23.
- 29) 辻 元人 (1997): 京都府立大学農学部 植物病理学研究室 修士論文
- 30) TURGEON, B. G. et al. (1993): Mol. Gen. Genet. 238: 270~284.
- 31) URBAN, M. et al. (1996): Mol. Gen. Genet. 251: 31~37.
- 32) VIDAL-CROS, A. et al. (1994): Eur. J. Biochem. 219: 985~992.
- 33) XU, J. R. and J. E. HAMER (1996): Genes Dev. 10: 2696~2706.