学会賞受賞者講演

ウリ類炭そ病菌の付着器侵入機構に関する研究[†]

久保 康之*

KUBO, Y.*: Studies on mechanisms of appressorial penetration by *Colletotrichum lagenarium*

植物病原糸状菌の細胞は植物体への感染に適した形態的分化と機能的分化をする。その多くは無性生殖器官である胞子を感染源とし、宿主植物表面への定着後、侵入器官、栄養菌糸形成を行う。炭そ病菌やいもち病菌はメラニン化を伴う発達した付着器を形成する。両菌においてメラ

ニン合成は侵入力を発揮する上で機能的に必須の働きをしており、広義の病原性因子と位置づけることができる。ウリ類炭そ病菌を研究材料とした付着器侵入におけるメラニン合成の役割とメラニン合成阻害防除薬剤の作用機構に関する研究、および新規の病原性関連代謝系の探索をめざした病原菌研究を進めてきた。

1. ウリ類炭そ病菌メラニン合成の生理・生化学的研究

付着器侵入を行う病原糸状菌のうち、炭そ病菌、いもち病菌は暗褐色に着色した付着器を形成する。侵入時における付着器の着色化の役割については未解明であった。ウリ類炭そ病菌を用い、付着菌の着色化の意義を解明した。

(1) メラニン合成欠損株と付着器侵入能

ウリ類炭そ病菌のアルビノ変異株を分離した。アルビノ変異株は無色の付着器を形成し、植物体上で側部発芽を行い植物体への侵入能を欠いていたことから、付着器の着色化が侵入に重要な働きをしていることを示唆した。次に、アルビノ変異株とは欠損点の異なるメラニン合成欠損株を分離し、メラニン合成系中間代謝産物 Scytalone を分離同定した。Scytalone は Pentaketide 由来の二次代謝産物であり、本菌の付着器色素が 1,8-dihydroxynaphthalene をサブユニットとするメラニンであると推定された。Scytalone 存在下でアルビノ変異株の付着器はメラニン化を回復する

と同時に侵入能を回復した。この結果から、付着器のメラニン化が侵入に必須であることが示された。電子顕微鏡観察からメラニン形成部位は細胞壁の最内層であり、貫穿糸を形成する貫穿糸突出孔はメラニン化していないことを明らかにした。付着器のメラニン化は付着器の側部発芽を抑え、貫穿糸の形成（侵入）を誘導していると考えられた。

(2) メラニン合成阻害剤の作用機構

メラニン合成阻害系の抗いもち剤である Tricyclazole の作用点と侵入阻止機構について検討した。Tricyclazole 処理により、3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-1(2H)naphthalenone を分離、同定し、Tricyclazole はメラニン合成系において 1,3,8-trihydroxynaphthalene の Vermelone への転換を阻害することを明らかにした。Tricyclazole 存在下で付着器の着色化は阻害されるが、阻害作用点下流のメラニン中間代謝産物 Vermelone を処理すると付着器は着色を回復し、同時に侵入能を著しく回復した。この結果から Tricyclazole の作用効果は 1,3,8-trihydroxynaphthalene から Vermelone への転換阻害からもたらされる付着器のメラニン化阻害に基づくものであることを明らかにした。さらに、Polyketide 合成阻害剤 Cerulenin のメラニン合成に対する効果を検討した。Cerulenin は付着器のメラニン化と侵入を著しく阻害した。また Cerulenin 存在下で Scytalone を処理によりメラニン化と侵入能は回復した。この結果から Cerulenin は付着器のメラニン合成初期過程にあたる Polyketide 合成を特異的に阻害すること、また、その結果として、侵入阻害効果がもたらされることを明らかにした。さらに、新規抗いもち剤 Carpromapid が *in vitro* における scytalone dehydratase の酵素反応を阻害すること示し、この阻害反応が病原菌の感染阻止をもたらすことを明らかにした。

(3) メラニン合成系の制御

付着器形成過程でのメラニン合成代謝系の発現制御を検

[†] 平成17年3月29日 平成17年度大会にて行われた学会賞受賞者講演の要旨

* 京都府立大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522, Japan

討した。付着器形成過程で¹⁴C-Scytaloneのメラニン画分への取り込みは付着器の膨潤完了直後（発芽開始6時間後）から認められた。また、蛋白質合成阻害剤による阻害実験では発芽開始40分以降の蛋白質合成を抑えてもメラニン合成は正常に行われた。この結果から、メラニン合成系はすでに胞子内に不活性状態で存在していたか、あるいは発芽初期40分以内に合成された酵素系が付着器の膨潤を完了した発芽開始6時間後以降の活性化により働き出すと考えられた。

2. ごま葉枯病菌メラニン合成の遺伝学的研究

付着器のメラニン合成の研究で扱ってきたウリ類炭そ病菌は有性生殖世代を欠いた不完全菌類に属し、交配に基づく遺伝学的研究には適していない。そこで、遺伝学的解析が可能であるごま葉枯病菌を用い、メラニン合成系遺伝子の遺伝学研究を行った。まず、ごま葉枯病菌のメラニン合成欠損変異株を数種分離し、蓄積されるメラニン合成系代謝産物の分析から、ごま葉枯病菌がウリ類炭そ病菌と同様のPolyketide由来のdihydronaphthalene系のメラニン合成系路を有していることを明らかにした。メラニン合成変異株間の交配実験から、同定したメラニン合成系遺伝子3種(*Alm*, *Scy*, *Brm*)のうち*Alm*と*Brm*が密接に連鎖し、*Scy*は両者との連鎖関係が認められないことを明らかにした。また、分子遺伝学的解析の基礎研究としてScytaloneを1,3,8-trihydroxynaphthaleneに転換するScytalone dehydrataseの純化を行い、23キロダルトンの単一ポリペプチドを得た。

3. ウリ類炭そ病菌の形態分化機構の分子遺伝学的研究

感染器官の形態分化機構の解明を目的として感染器官形成時における遺伝情報の発現、および環境応答機構を分子遺伝学的に解析した。

(1) メラニン合成系遺伝子

宿主侵入に必須の代謝系であるメラニン合成の合成遺伝子のクローニングを進め、3種のメラニン合成酵素遺伝子(polyketide synthase : *PKS1*, scytalone dehydratase : *SCD1*, 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase : *THR1*)の構造・機能解析を行った。これらの遺伝子の破壊株は何れも付着器のメラニン合成欠損を示し、感染能を欠いていた。したがって、これらの遺伝子は広義の意味で病原性遺伝子を位置づけることができる。さらに、これらのメラニン合成系遺伝子の発現が発芽に連動した転写制御および付着器の分化に連動した翻訳制御機構のもとにあることをノーザンブロットおよびウエスタンブロット分析によって明らかにするとともにメラニン合成系遺伝子の発現を制御する転写

制御因子*CMR1*の構造・機能解析に成功した。*CMR1*はCys6 zinc binuclear clusterとCys2His2 zinc fingerの2つのDNA結合モチーフを有するこれまで報告事例のない極めてユニークな構造的特徴を示す転写因子であり、*SCD1*, *THR1*遺伝子の発現を正に制御することを明らかにした。また、大腸菌内にて組換えタンパク質を用いたメラニン合成酵素による*in vitro*の酵素反応実験系の確立に成功し、これまで未解明であったpolyketide合成酵素の触媒産物1,3,6,8-tetrahydroxynaphthaleneであることを明らかにした。

(2) 形態分化関連遺伝子

侵入器官の形態分化機構解明を目的として、侵入能欠損突然変異株の変異相補実験および形態形成特異的cDNAライブラリーのデファレンシャルスクリーニング法により発芽・付着器形成時に特異的に発現する遺伝子の同定、構造解析を行った。一方、病原菌の形態形成を環境応答として捉え、付着器の分化を誘導する信号伝達系の解明を進め、酵母のフェロモン応答性のMAPキナーゼ信号伝達経路に相当するMAPキナーゼ遺伝子のクローニングに成功した。遺伝子破壊実験により、このMAPキナーゼ経路が胞子発芽、付着器形成、植物組織内進展に多面的に関与することを明らかにした。

細胞の環境応答に関わる因子としてMAPキナーゼが機能している。ウリ類炭そ病菌のMAPキナーゼ*CMK1*をクローニングし、遺伝子破壊実験からこのMAPキナーゼが胞子発芽、付着器形成、宿主内進展など多面的な形態形成に関与していることを明らかにした。また、*CMK1*の下流で制御を受けていると推定される転写因子遺伝子*CST1*をクローニングし、この遺伝子が付着器の成熟、貫穿糸形成に関与していることを明らかにした。

(3) アグロバクテリウム形質転換法による遺伝子タギング系の確立

アグロバクテリウムを用いたウリ類炭そ病菌の形質転換系(AtMT法)を確立した。AtMT法により従来のプロトプラスト-ポリエチレン法に比較して、高い形質転換効率を安定して得ることができた。本法を利用したT-DNA挿入による遺伝子タギング実験により病原性に関連のある遺伝子のクローニングを効率的に行うことが可能となった。これまで、メラニン合成系関連遺伝子に加えて、脂肪酸代謝、細胞壁合成、転写因子、アミノ酸代謝関連遺伝子をクローニングし、これらが病原性に関与していることを明らかにした。

おわりに

今から25年前、ウリ類炭そ病菌の突然変異株の分離とその利用をテーマに行った卒業論文がこれまでの研究の基盤となっている。病原菌の感染過程を細胞の形態的、機能的分化と捉え、それを遺伝学的に捉えるというスタンスで生物現象を見ることは、当時の直接の指導教官であった古澤 巖、石田紀郎両先生からご教授頂いたものである。この間、分子遺伝学の発展は目覚ましいものであったが、時代にマッチした視点であったことは、自分の仕事よりも、この分野におけるイネいもち病研究を筆頭とする内外の研究者の業績の蓄積がそれを証明している。古澤、石田両博士の慧眼に感謝は尽きない。また、主とした研究テーマとなった付着器のメラニン合成研究は生物現象としての興味だけに留まらず農薬メーカーの努力によるメラニン合成系を標的とする薬剤の開発により病害防除の応用面で大きな実績を挙げている。病原菌の感染戦略の解明が農業現場の病害防除につながることを肌で感じつつ研究を進めることができたことに感謝している。メラニン合成は病原性因子の一つの代表選手であり、今後、病原性を特徴づける代謝

系のさらなる解明により環境調和的な防除戦略の案出、優れた防除薬剤の開発が行われると信じる。

最後に、本研究は京都大学および京都府立大学植物病理学研究室で遂行されたものであり、ご指導、ご協力を賜りました方々に篤く御礼申し上げます。

京都大学の山本昌木、獅山慈孝、津田盛也先生には多大なご指導、ご鞭撻を賜りました。多賀正節博士には菌類遺伝学の基礎をご教授賜りました。鈴木一実博士には炭そ病菌研究の全般にわたり、ご指導を賜りました。山口 勇博士にはメラニン合成阻害剤研究で多くのご指導を賜りました。柘植尚志博士には糸状菌の分子遺伝学的研究を強く支えて頂きました。遺伝子発現制御研究は高野義孝博士、辻元人博士の貢献によるものです。京都府立大学での研究では堀野 修博士、津下誠治博士に多大な支援を頂きました。また、研究の大部分は大学院生として関心をともにした学生諸氏の新しい発想と努力の結晶です。興味深い生物現象にめぐり会えたこと、そして優れた指導者と学生諸氏にめぐり会えたことに感謝の念は尽きません。