J S M *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco

The mode of phytotoxic action of trichothecenes during plant-*Fusarium* interaction; our approach to detoxification of trichothecenes in cereals.

Takumi Nishiuchi, Makoto Kimura, Kazuhiro Sato

JSM Mycotoxins, **65**(2):143-147 (2015)

<http://dx.doi.org/10.2520/myco.65.143>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, and Notes), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

ムギ類赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒の植物における作用機構と低減化へのアプローチ

西内 巧¹, 木村 真², 佐藤 和広³

¹金沢大学学際科学実験センター (〒920-0934 石川県金沢市宝町13-1)

²名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町)

³岡山大学資源植物科学研究所 (〒710-0046 岡山県倉敷市中央2-20-1)

キーワード

エフェクター；かび毒；解毒；抵抗性品種；トリコテセン；ムギ類赤かび病；*Fusarium*

連絡先

西内 巧, 金沢大学学際科学実験センター, 〒920-0934 石川県金沢市宝町13-1

電子メール: tnish9@staff.kanazawa-u.ac.jp

(2015年7月21日受付,

2015年7月28日受理)

要旨

ムギ類赤かび病菌 (*Fusarium graminearum*, *F. asiaticum*等) は, コムギ, オオムギ等のムギ類やトウモロコシの穂などに感染し, これらに甚大な被害を及ぼす難防除性の植物病原糸状菌である. 加えて, 本菌が産生するトリコテセン系かび毒が食物や飼料に混入すると, ヒトや家畜に免疫抑制や食中毒等の深刻な健康被害を及ぼすことから, 世界的に問題になっている. また, トリコテセンは熱に安定で, 調理過程でほとんど分解されないため, 穀物中におけるかび毒蓄積を低減化することが求められる. トリコテセンは, 真核生物のリボソームに結合してタンパク質合成を阻害し, ファイトトキシンとしても作用することから, 植物への感染過程でエフェクターとして作用すると考えられており, 赤かび病抵抗性品種や変異体においてもトリコテセンかび毒蓄積が期待通りに減少しないことも多い. 筆者らは, オオムギの低かび毒蓄積品種に赤かび病菌を接種すると, 解毒に関わることが示唆されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (*GST*) 遺伝子とグルタチオン還元酵素 (*GR*) 遺伝子が, 高蓄積品種に比べて顕著に高発現をしていることを見出した. これらの遺伝子について機能解析を進めると同時に, 同定済みの赤かび病に対する侵入・進展抵抗性に関わる遺伝子を組み合わせることで, 効果的に赤かび病を防除し, 病徴とかび毒蓄積の両方を顕著に低減化する植物の作出を目指している.

はじめに

植物病原糸状菌には二次代謝物として, かび毒 (マイコトキシン) を産生するものが知られており, 感染した作物やそれらを原料とした食品等にかび毒が混入し, ヒトや家畜に発がん, 免疫抑制, 食中毒等の深刻な健康被害を及ぼしている¹⁾. かび毒には多様な分子種が存在するが, 中でも難防除性の赤かび病菌 (フザリウム属菌) が産生するトリコテセン系かび毒は, コムギ, オオムギやトウモロコシ等で非常に高頻度に検出され, その作物汚染が世界的に問題になっている. トリコテセンは, 真核生物のリボソームに結合してタンパク質合成を阻害することから, ヒトや家畜が摂取すると, 食中毒や免疫抑制等の健康被害を引き起こすことが知られてい

る²⁾. トリコテセンは, 赤かび病菌が植物へ感染する過程で病原性因子として作用することが知られていたが, ファイトトキシンでもあることから, エフェクターと考えられるようになった^{2),3)}. このエフェクターとしての作用が影響しているためか, 赤かび病による病徴とかび毒蓄積が相関しない事例も多く報告されている. 特に, 病徴が弱い植物でもかび毒が高蓄積することも多いことから, 植物への感染過程におけるかび毒の作用, また作物におけるかび毒低減化を焦点とした研究の必要性が認識されるようになった. ここでは, 植物におけるかび毒の作用やかび毒の解毒機構について概説し, ムギ類におけるかび毒低減化を目指した筆者らの取り組みについても紹介したい.

1. かび毒汚染を防ぐための抵抗性植物の作出

*Fusarium*属の赤かび病菌 (*F. graminearum*, *F. asiaticum*等)は、作物の茎葉の残渣に腐生して伝染する植物病原糸状菌で、コムギ、オオムギおよびトウモロコシ等を宿主とし、これらの開花期の穂に感染する。日本では、ムギの開花期が多雨期と重なる地域も多いことから、各地で被害が報告されている⁴⁾。本菌が産生するトリコテセン系かび毒は熱に安定であり、調理過程でほとんど分解されないため、穀物におけるかび毒蓄積を防ぐことが、かび毒汚染による被害を減らす最善の策である。赤かび病菌に対する植物の抵抗性は、菌の特定のレースに対して単一の抵抗性遺伝子によって制御されるような非親和性の関係は知られておらず、植物側の多くの遺伝子によって抵抗性が制御されると考えられる³⁾。従って、抵抗性品種から単一遺伝子を栽培品種に導入することで、顕著に抵抗性が向上するような効果は期待できない。赤かび病に比較的抵抗性の品種も知られてはいるが、不良な栽培特性を伴うことも多い。このため、赤かび病に高度に抵抗性の品種は未だに育成されておらず、殺菌性農薬を複数回散布することが現実的な防除法となっている。

赤かび病菌は開花期の穂に感染することから、受粉時に閉花していれば、感染をある程度回避できる。オオムギの*Cly1*遺伝子は、開花性に必要なAP2ファミリーに属する転写因子をコードしており、一塩基変異により機能が欠損すると閉花性になることが明らかにされている⁵⁾。閉花性オオムギは、赤かび病菌の栄養源となる葯への感染の機会を減少させるため、抵抗性も向上することが明らかにされている。しかしながら、閉花性のオオムギも、赤かび病に全く罹らない訳ではなく、発病してかび毒蓄積も見られる。従って、赤かび病の防除のためには、閉花性のように感染の機会を減少させる遺伝子に加えて、植物自らが防除に関わる遺伝子を活用する必要がある。また、後述のように筆者らは、赤かび病の穂の罹病率が罹病性品種の1/5程度まで減少した品種でも、かび毒蓄積は50%位までしか減少しないことを明らかにしており、赤かび病を防除するには感染を軽減するだけでなく、かび毒低減化に焦点を当てた研究の重要性を痛感している。

2. 赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒について

赤かび病菌が産生するトリコテセン系かび毒はセスキテルペノイドで、C8位のカルボニル基の有無によって、タイプBとタイプAに分けられる。タイプBトリコテセンには、デオキシニバレノール

(DON)やニバレノール(NIV)が含まれ、特にDONは日本だけでなく世界中で穀物汚染が報告されている。また、NIVは日本を含むアジア地域で汚染の報告例が多く、動物細胞に対する毒性は、DONよりも高い可能性が示唆されている⁴⁾。わが国においては、東日本ではDONを産生する*F. graminearum*が分布しており、西日本以南ではNIVを産生する*F. asiaticum*も見られる。これらにおいては、菌株によって決まったトリコテセン分子種を産生することが知られている。DONの許容量については原麦における濃度が1.1ppm以下という暫定的検査規格が設定されており、これを達成するため、開花期の穂に複数回、殺菌性農薬を散布しているのが現状である⁴⁾。この防除に用いる有効な既存の殺菌性農薬も知られているが、これらに対する耐性菌出現の報告もあり、赤かび病菌のかび毒産生を効果的に阻害できる新規化合物の開発が求められている。

3. トリコテセン系かび毒の植物における作用

前述したように、トリコテセンには、真核生物のリボソームに結合し、タンパク質合成を阻害するリボトキシンとしての作用が知られていた。しかしながら、その植物における作用についてはほとんど明らかにされていなかった。そこで筆者らは、赤かび病に罹病性のシロイヌナズナの培養細胞を用いて⁶⁾、トリコテセンが実際に植物細胞においてもタンパク質合成を阻害すること、コムギ胚芽由来の翻訳系にトリコテセンを添加した場合にもタンパク質合成を阻害することを明らかにした^{7),8)}。また、トリコテセン各分子種を含む培地でシロイヌナズナの種子を育成したところ、いずれも生育が抑制され、各分子種はファイトトキシンとして機能したが、その種類によって形態形成や生育への影響が異なることが分かった⁷⁾。一般的に使用されるタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドが、生育を抑制するものの形態的な異常は誘導しないので、トリコテセンにはタンパク質合成阻害以外の活性もあることが示唆された。この活性をさらに調べるため、シロイヌナズナの葉にT-2トキシンなどタイプAトリコテセンを含む溶液を注入したところ、疑似病斑が形成され、細胞死が誘導された⁸⁾。この際、シグナル伝達に重要な役割を担うMAPK (mitogen-activated protein kinase) が迅速に活性化し6時間持続した。また、同時に植物の防御応答に中心的な役割を果たすシグナル物質のサリチル酸も蓄積しており、防御応答のマーカー遺伝子の発現誘導も見られた^{8),9)}。これらの結果から、トリコテセンは植物の防御応答を誘導するエリシター様の活性を有

することが明らかとなった。一方で、タイプBトリコテセンのDONをシロイヌナズナに注入するとその活性は弱かったが、コムギへの注入では細胞死誘導活性等が見られた¹⁰⁾。これらの結果から、宿主植物への感染初期から中期の低濃度DON蓄積は、宿主のタンパク質合成を部分的に阻害し、感染後期の高濃度のDON蓄積は宿主の細胞死を誘導し、腐生的に感染拡大が起こると考えられる。

4. 植物におけるトリコテセンの解毒について

トリコテセン系かび毒は赤かび病菌自身にも毒性を有するため、赤かび病菌自らは、トリコテセンアセチル化酵素 (TRI101) により、トリコテセンのC3位をアセチル化して毒性を低減していることが報告されている¹¹⁾。すなわち、赤かび病菌はトリコテセンをアセチル化体として細胞内に蓄積させ、植物への感染過程でアセチル基を外して、トランスポーターで細胞外に排出させると考えられている¹⁾。一方、植物においてもトリコテセンの解毒機構が2つ報告されている。1つ目は、シロイヌナズナにおいて、DONグルコシルトランスフェラーゼ (DOGT) により、デオキシニバレノールをグルコシル化して低毒化することである¹²⁾。DOGTのオルソログは、コムギやオオムギ等でも見られることから、この解毒機構はこれらの植物にも共通している可能性がある。また、赤かび病に感染した作物からNIVの配糖体も検出されているが、DOGTとは異なるグルコシルトランスフェラーゼ (UGT) によるものであることが示唆されている。2つ目は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) により、デオキシニバレノールをグルタチオンで抱合し、細胞外に排出する解毒機構である¹³⁾。GSTは5つのグループに分類される非常に大きな遺伝子ファミリーを形成しており、解毒に関わることが示唆されるPhiとTauファミリーのGSTだけでもシロイヌナズナには約40あるため¹⁴⁾、トリコテセンを生体内で効果的に解毒できるGSTを同定することがカギになってくる。宿主のかび毒低減化には、植物が本来供えているこれらの解毒機構をムギ類の育種に応用することが重要であると考えられる。

5. ムギ類におけるかび毒低減化に関わる遺伝子の探索

植物病原菌に対する植物の抵抗性は、侵入抵抗性や進展抵抗性等に区別されるが、赤かび病菌の場合には、かび毒蓄積の抵抗性が加えられる。赤かび病抵抗性を分類する際には、ムギ類の穂の組織内への侵入抵抗性をタイプI抵抗性、穂全体への進展抵抗

性をタイプII抵抗性、さらにかび毒蓄積抵抗性をタイプIII抵抗性とされており、一般的に用いられる宿主細胞における侵入・進展抵抗性とは異なる¹⁵⁾。

筆者らは、赤かび病による病徴によって抵抗性の明らかなオオムギの15品種について、赤かび病菌 (*F. asiaticum*) を人工接種した際のかび毒 (NIV) 蓄積を調べた。開花期の穂に赤かび病菌の胞子液を噴霧接種して病徴を観察したところ、罹病性品種 (高発病・高かび毒) における発病率は80-90%を示したのに対して、複数の抵抗性品種では20-30%であった。しかしながら、これらの抵抗性品種においてもNIV蓄積は罹病性品種の50%程度であった (低発病・低かび毒品種)。この結果は、赤かび病の発病を指標にした抵抗性品種の選抜に加えて、かび毒蓄積を指標にしたタイプIII抵抗性品種の選抜の重要性を強く示唆する。実際に、20%程度の発病率でありながら、NIV蓄積は罹病性品種と同程度の品種も見られた (低発病・高かび毒品種)。一方で、発病率は50%と比較的高いもののかび毒は50%以下に減少している品種も見られた (中発病・低かび毒品種)。これらの低かび毒品種の穂に赤かび病菌を人工接種した試料を用いて、マイクロアレイ解析を実施したところ、Phiクラスに属するGST遺伝子と還元型グルタチオンを供給するGR (グルタチオン還元酵素) 遺伝子の発現が低かび毒品種で特異的に上昇していた。現在、これらがムギ類におけるかび毒低減化の候補遺伝子と考え、機能解析を進めているところである。

6. 赤かび病抵抗性に関わる新規遺伝子の機能解明

筆者らは、シロイヌナズナを中心にタイプI及びII抵抗性に関わる遺伝子を複数単離して機能解析を進めてきたが、ここでは、分泌タンパク質であるチオニンについて紹介したい^{2),9),16)}。コムギ、オオムギ等の複数の植物で、赤かび病菌等の病原糸状菌に対する抗菌タンパク質として、チオニン等の分泌タンパク質が知られている。筆者らは、シロイヌナズナの花で特異的に発現するThi2.4の作用機構について解析を進め、細胞外に分泌されたThi2.4が赤かび病菌が分泌するレクチンタンパク質 (FFBL) と相互作用することを見出した。また、FFBLをシロイヌナズナの葉に注入すると細胞死が起き、赤かび病菌の胞子液を葉に接種する際にFFBLを添加すると、顕著に病徴が進展した。さらに、FFBL遺伝子をノックアウトした赤かび病菌は病原性が低下することから、FFBLは腐生性のある赤かび病菌の病原性因子として作用することが示唆された。興味深いことに、FFBLは*Fusarium*属菌のゲノムに良く

保存されているが、いもち病菌等ではホモログが見られなかった。シロイヌナズナの*Thi2.4*過剰発現株では、赤かび病抵抗性を示すことに加えて、FFBLによる細胞死誘導率が有意に減少したことから、*Thi2.4*は細胞外に分泌され、病原性タンパク質であるFFBLに結合し、その作用を抑える働きがあることも示唆された。本研究により、細胞外領域における赤かび病菌と植物の分泌タンパク質の相互作用が、赤かび病菌に対する防御応答に重要な役割を担うことが明らかとなった。このように、チオニンのような赤かび病防除に効果的な分泌性タンパク質を活用すれば、赤かび病菌の細胞内への侵入を防ぐ効果が期待できる。

おわりに

上記のように、赤かび病による病徴が軽減したオオムギ品種やシロイヌナズナの変異体においても、かび毒蓄積は予想よりも減少しないことが多い。仮にかび毒がエフェクターとして作用しているならば、侵入抵抗性や進展抵抗性を向上させても、かび毒蓄積の問題を解決できない可能性も考えられる。従って、これらの赤かび病抵抗性に関わる遺伝子の機能解析と並行して、かび毒低減化に直接的に関与する解毒遺伝子を同定することが重要となる。このため筆者らが進めているオオムギの低かび毒品種で高発現している*GST*遺伝子や*GR*遺伝子の機能を解明することは意義がある。赤かび病の防除には作用の異なる多くの宿主遺伝子に関与していると考えられる。効果的な防除にはこれらの遺伝子をタイプ分けして、それらを組み合わせることが重要である。また、赤かび病防除に効果的な新規作用を有する化合物やかび毒合成の阻害剤を同定して実用化すれば、殺菌剤に依存している赤かび病防除の現状を大きく改善できると考えられる。

謝 辞

本稿で紹介した植物の赤かび病抵抗性とかび毒低減化に関する内容は文部科学省科学研究費、農林水産省次世代ゲノムプロジェクト (TRS1005)、日本科学技術事業団研究費の支援を受けて行った。

引用文献

- Kimura, M., Takahashi-Ando, N., Nishiuchi, T., Ohsato, S., Tokai, T., Ochiai, N., Fujimura, M., Kudo, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I.: Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination. *Pestic Biochem Physiol*, **86**, 117-123 (2006)
- Nishiuchi, T.: "Plant responses to *Fusarium* metabolite" In *Fusarium: genomics, molecular and cellular biology* (Brown, D. W., Proctor, R. H., Eds.), pp. 165-178 (2013), Horizon Scientific Press, UK
- Kazan, K., Gardiner, D. M., Manners, J. M.: On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Mol Plant Pathol*, **13**, 399-413 (2012)
- 須賀 晴久: ムギ類赤かび病菌における近年の研究動向. *日植病報*, **72**, 121-134 (2006)
- Nair, S. K., Wang, N., Turuspekov, Y., Pourkheirandish, M., Sinsuwongwat, S., Chen, G., Sameri, M., Tagiri, A., Honda, I., Watanabe, Y., Kanamori, H., Wicker, T., Stein, N., Nagamura, Y., Matsu-moto, T., Komatsuda, T.: Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided HvAP2 mRNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 490-495 (2010)
- Urban, M., Daniels, S., Mott, E., Hammond-Kosack, K.: *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant J*, **32**, 961-973 (2002)
- Masuda, D., Ishida, M., Yamaguchi, K., Yamaguchi, I., Kimura, M., Nishiuchi, T.: Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, **58**, 1617-1626 (2007)
- Nishiuchi, T., Masuda, D., Nakashita, H., Ichimura, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Kimura, M., Yamaguchi, I., Yamaguchi, K.: *Fusarium* phytoxin trichothecenes have an elicitor-like activity in *Arabidopsis thaliana*, but the activity differed significantly among their molecular species. *Mol Plant-Microbe Interact*, **19**, 512-520 (2006)
- Asano, T., Masuda, D., Yasuda, M., Nakashita, H., Kudo, T., Kimura, M., Yamaguchi, K., Nishiuchi, T.: *AtNFXL1*, an *Arabidopsis* homologue of the human transcription factor NF-X1, functions as a negative regulator of the trichothecene phyto-toxin-induced defense response. *Plant J*, **53**, 450-464 (2008)
- Desmond, O. J., Manners, J. M., Stephens, A. E., Maclean, D. J., Schenk, P. M., Gardiner, D. M., Munn, A. L., Kazan, K.: The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Mol Plant Pathol*, **9**, 435-445 (2008)
- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K., Yamaguchi,

- I.: Trichothecene 3-*O*-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of *Tri101*. *J Biol Chem*, **273**, 1654-1661 (1998)
- 12) Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C., Adam, G.: Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, **278**, 47905-47914 (2003)
- 13) Gardiner, S. A., Boddu, J., Berthiller, F., Hametner, C., Stupar, R. M., Adam, G., Muehlbauer, G. J.: Transcriptome analysis of the barley–deoxynivalenol interaction: evidence for a role of glutathione in deoxynivalenol detoxification. *Mol Plant-Microbe Interact*, **23**, 962-976 (2010)
- 14) Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R.: Plant glutathione transferases. *Genome Biol*, **3**, REVIEWS 3004 (2002)
- 15) Bai, G. H., Desjardins, A. E., Plattner, R. D.: Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, **153**, 91-98 (2002)
- 16) Asano, T., Miwa, A., Maeda, K., Kimura, M., Nishiuchi, T.: The secreted antifungal protein thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* suppresses the toxicity of a fungal fruit body lectin from *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog*, **9**, e1003581 (2013)

The mode of phytotoxic action of trichothecenes during plant-*Fusarium* interaction; our approach to detoxification of trichothecenes in cereals.

Takumi Nishiuchi¹, Makoto Kimura², Kazuhiro Sato³

¹Division of Functional Genomics, Advanced Science Research Center, Kanazawa University, 13-1 Takaramachi, Kanazawa, Ishikawa 920-0934, Japan

²Department of Biological Mechanisms and Functions, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

³Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, 2-20-1 Chuo, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan

Phytopathogenic fungi *Fusarium* species are etiological agents of *Fusarium* head blight (FHB) and produce trichothecene mycotoxins such as deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) in cereals especially barley and wheat. Trichothecenes inhibit the protein synthesis in eukaryotic ribosomes. Therefore, trichothecene-contaminated cereals often cause foodborne illness such as immunosuppression, vomiting, and diarrhea in human and livestock. Trichothecenes are also phytotoxins and act as effectors to promote infection in host plants. Based on visible disease symptoms, we selected 15 FHB-resistant lines of barley. When these resistant lines and susceptible controls were inoculated with conidia of *F. asiaticum*, the mycotoxin (NIV) contaminations of resistant two lines were less than half of those of susceptible controls. Furthermore, we performed comparative analysis of global gene expression profiles between these FHB-resistant (low NIV accumulation) lines vs. susceptible controls. A number of genes including the glutathione S-transferase (*HvGST13*) and glutathione reductase (*HvGR2*) were specifically up-regulated in the FHB-resistant lines. It is likely that these two genes are involved in the detoxification of NIV by NIV-GSH conjugation in barley. Therefore, we are studying these genes as candidates of trichothecene-detoxifying genes. This study may contribute to the understanding molecular mechanism of trichothecene detoxification in cereals.

Keywords: detoxification; disease resistance; *Fusarium* head blight (FHB); mycotoxin; trichothecene