

植物病原糸状菌の光応答機構に関する研究

木原 淳一（島根大学 生物資源科学部）

j-kihara@life.shimane-u.ac.jp

植物病原糸状菌であるイネごま葉枯病菌の分生孢子形成における光調節反応は、宿主植物であるイネへの効率的な感染に重要であると考えられている。そこで、イネごま葉枯病菌の光応答機構の分子基盤を解明するため、多くの近紫外線調節遺伝子を明らかにするとともに、光センシング（光受容）に関与する光受容体の存在を明らかにした。以上の研究成果は、植物病原糸状菌側からの、光による植物保護技術の開発につながるものと期待される。

はじめに

食糧生産に深刻な被害をもたらす植物病害の約 80%は植物病原糸状菌が原因であり、近年、生物多様性に配慮した農業生産や、食の安全・安心のニーズから、化学的防除以外の物理的・生物的・耕種的防除における新しい植物保護技術の開発が求められている。その中で、光を利用した植物病原糸状菌に対する植物保護技術の開発を指向するためには、「植物」及び「植物病原糸状菌」の双方において、感染・発病に及ぼす光の影響やそのメカニズムを明らかにする必要がある。筆者は、植物病原糸状菌側からのアプローチとして、イネごま葉枯病菌をモデルに、その光応答機構に関する生態学的・分子生物学的研究を行ってきた。

イネごま葉枯病菌の孢子形成光調節反応

イネに斑点病を引き起こすイネごま葉枯病菌 (*Bipolaris oryzae*) (図 1) の分生孢子形成は、紫外線 (UVB) によって誘導されるが、その誘導効果は青色光 (UVA/Blue) によって打ち消される、といったユニークな拮抗的光反応によって調節されている (図 2)。日本各地から分離したイネごま葉枯病菌の 99%以上がこの光調節反応を持つ「光誘導型」であり、さらに胞



図 1 イネごま葉枯病菌の罹病葉 (上) とイネごま葉枯病菌の分生孢子 (下)

子形成に光を必要としない「非光誘導型」の存在も明らかにした^{1, 2, 3)}。また、光誘導型と非光誘導型は交配が可能で、遺伝学的解析から、この光調節反応には少なくとも 2つの遺伝子が関与している可能性を示した⁴⁾。

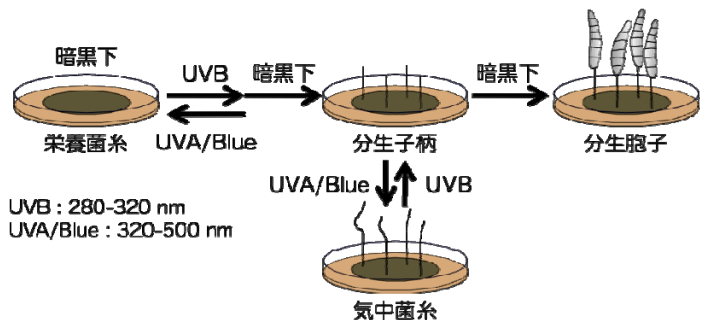


図 2 イネごま葉枯病菌の拮抗的孢子形成光調節反応の模式図
本菌の分生孢子は暗黒下では形成されず、紫外線 UVB によって誘導されるが、その効果は UVA/Blue によって打ち消される。この紫外線 UVB と UVA/Blue の作用は拮抗的である。

近紫外線調節遺伝子の探索

ブラックライトブルー (BLB) 蛍光灯が放射する近紫外線 (波長 300-400nm) は、イネごま葉枯病菌の孢子形成を誘導する紫外線と孢子形成を阻害する UVA/青色光を含む。近紫外線照射によるイネごま葉枯病菌の光応答機構を遺伝子レベルで解析するため、近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子の探索を行なった。

1) 新規近紫外線誘導遺伝子

Differential screening 法により、近紫外線照射によって発現量が増加する新規の遺伝子をイネごま葉枯病菌ではじめて明らかにし、*UVI-1* (UV-inducible gene 1) と名付けた⁵⁾。*UVI-1* 遺伝子の発現増加は近紫外線特異的であり、青色光や赤色光では増加しないことを示した。*UVI-1* タンパク質の機能については今のところ明らかにされていないが、他の植物病原糸状菌にも相同な遺伝子が存在することから、その役割が注目される。

2) メラニン合成系遺伝子

ヒトにおいて紫外線照射がメラニン合成系遺伝子の発現を増加させることから、イネごま葉枯病菌のメラニン合成系遺伝子に着目し研究を行なった。その結果、メラニン合成に必須なポリケチド合成酵素遺伝子 (*PKS1*)^{6,7)}、シタロン脱水酵素遺伝子 (*SCD1*)⁸⁾、及び 1,3,8-THN 還元酵素遺伝子 (*THR1*)⁹⁾ の 3 つの遺伝子の発現はいずれも近紫外線照射特異的に増加したが (図 3)、青色光や赤色光ではその効果は小さいことを明らかにした。さらに、これらメラニン合成系遺伝子の転写制御因子をコードする遺伝子 (*BMR1*) の発現もまた、近紫外線照射によって増加することを確認し、これが下流の 3 つのメラニン合成系遺伝子の発現を高める要因のひとつであることを示唆した¹⁰⁾。

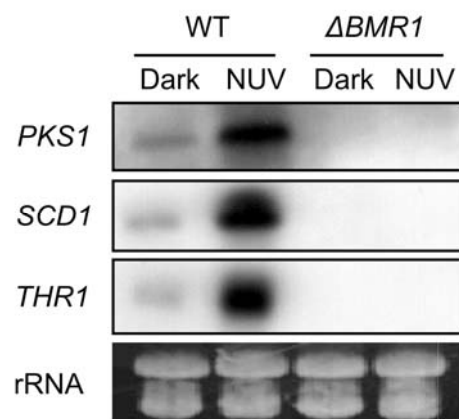


図 3 メラニン合成系遺伝子の発現解析
WT: 野生株 $\Delta BMR1$: *BMR1* 遺伝子破壊株
Dark: 暗黒下 NUV: 近紫外線 1 時間照射

3) 光回復酵素遺伝子

イネごま葉枯病菌では、紫外線により生じた DNA 傷害が青色光照射で回復する「光回復現象」が確認されている¹¹⁾。そこで、イネごま葉枯病菌から光回復酵素遺伝子をクローニングし、機能解析と発現解析を行なった。その結果、光回復酵素遺伝子も近紫外線照射によって発現量が増加することが明らかとなった¹²⁾。また、光回復酵素遺伝子破壊株では、光回復能が認められず、紫外線に対する耐性も低下することが示唆された。

MAP キナーゼシグナル伝達系の解析

近紫外線照射による近紫外線調節遺伝子の発現増加に MAP キナーゼシグナル伝達系が関与するか否かについて実験を行なった。その結果、extracellular signal-regulated kinases (ERKs) に属する *BMK1* 遺伝子は、病原性と孢子形成に重要であるが、近紫外線調節遺伝子の発現には関与しないと考えられた¹³⁾。一方、stress-activated protein kinases (SAPKs) に属する *SRM1* 遺伝子は、浸透圧ストレスのみならず近紫外線調節遺伝子の発現増加にも関与することが示唆された¹⁴⁾。

光受容体遺伝子

光応答の出発点は、光受容体による光の受容（光センシング）であることから、イネごま葉枯病菌の光受容体遺伝子の同定・解析を行なった。はじめに、モデル糸状菌アカパンカビの青色光受容体 WC-1/WC-2 相同遺伝子をイネごま葉枯病菌からクローニングし、この青色光受容体（BLR1/BLR2）がイネごま葉枯病菌の分生孢子形成及び一部の近紫外線誘導遺伝子の発現増加に関与することを明らかにした^{15, 16}。一方で、メラニン合成系遺伝子やその他の近紫外線誘導遺伝子の発現増加には、青色光受容体とは異なる未知の紫外線受容体に関与することが示唆された。また、動物・昆虫の光受容であるオプシンに類似のタンパク質をコードする *OPS1* 遺伝子及び *OPS2* 遺伝子を明らかにし、両遺伝子の発現が、上述の青色光受容体（BLR1/BLR2）によって制御されることを示した¹⁷。一方、植物のフィトクロム及びクリプトクロムに類似する遺伝子がイネごま葉枯病菌のゲノムに存在することも確認しており、光受容体からイネごま葉枯病菌の光応答機構を解明する糸口が得られた。

おわりに

イネごま葉枯病菌には、複数の光受容体による光センシングシステムが存在することが予想され、多くの植物病原糸状菌にも同様な光センシングシステムが存在すると考えられる。しかしながら、イネごま葉枯病菌の拮抗的孢子形成光調節反応は、すべての植物病原糸状菌では認められないことから、この光調節反応は、イネごま葉枯病菌が宿主植物であるイネに効率的に感染するため独自に適応したシステムと考えられる。イネごま葉枯病菌をモデルとして、植物病原糸状菌に共通した光応答の分子基盤を明らかにするとともに、それぞれの植物病原糸状菌の光環境応答の生態学的意義を明らかにすることは、植物病原糸状菌側からの研究成果を基にした、光による新たな病害防除に役立つと確信している。そして、将来的には、本研究を、植物側からのアプローチとして行なわれている光誘導抵抗性の研究^{18, 19, 20}と融合することで、宿主植物—植物病原糸状菌—光環境を総合的に視野に入れた、光による植物保護技術を実現していきたいと考えている。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたり、ご推薦いただきました日本植物病理学会会長白石友紀先生をはじめ同学会関係者の皆様並びに島根大学生物資源科学部長 谷口憲治教授に深く感謝申し上げます。本研究を行なうにあたり、島根大学名誉教授（現島根県立大学学長）本田雄一先生並びに東北大学名誉教授 熊谷忠先生には、学部・大学院時代に公私にわたりご指導ご鞭撻をいただきとともに、私を本研究の道に導いていただきました。島根大学生物資源科学部名誉教授 野津幹雄先生、同教授 荒瀬榮先生、同助教 上野誠先生、並びに、東北大学大学院生命科学研究科准教授 佐藤雅志先生及び日出間純先生には、本研究に対する全面的なご理解と多大なるご支援をいただきました。また、本研究の推進にあたり、名古屋大学大学院生命農学研究科教授 柘植尚志先生、京都府立大学大学院生命環境科学研究科教授 久保康之先生、神戸大学大学院農学研究科准教授 中屋敷均先生、京都大学大学院農学研究科准教授 田中千尋先生には、多大なるご支援をいただきました。さらに、森脇明弘博士をはじめ、東北大学及び島根大学の関連研究室に所属された同輩、後輩、学生の皆様のご協力をいただきました。本研究の成果は、皆様の暖かいご支援とご指導の賜物であり、ここに記して深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kihara J and Kumagai T (1994) Ecotypes of the fungus *Bipolaris oryzae* with various responses of the mycochrome system. *Physiologia Plantarum* 92: 689-695.
- 2) Kihara J, Ishikawa S, and Kumagai T (1997) Distribution of photo-induced and non-photo-induced sporulator phenotypes of *Bipolaris oryzae* in Japan. *Mycoscience* 38: 147-153.
- 3) Kihara J and Kumagai, T. (1999) Photo-control of conidial development in the fungus *Bipolaris oryzae*. *Recent Research Development in Photochemistry & Photobiology* 3: 51-64.
- 4) Kihara J, Ishikawa S, Sato A, and Kumagai T (1998) Inheritance of photo-control of conidial development in the fungus *Bipolaris oryzae*. *Mycoscience* 39: 89-91.
- 5) Kihara J, Sato A, Okajima S, and Kumagai T (2001) Molecular cloning, sequence analysis and expression of novel gene induced by near-UV light in *Bipolaris oryzae*. *Molecular Genetics and Genomics* 266: 64-71.
- 6) Moriwaki A, Kihara J, Kobayashi T, Tokunaga T, Arase S, and Honda Y (2004) Insertional mutagenesis and characterization of a polyketide synthase gene (*PKSI*) required for melanin biosynthesis in *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 238: 1-8.
- 7) Moriwaki A, Ueno M, Arase S, and Kihara J (2007) RNA-mediated gene silencing in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 269: 85-89.
- 8) Kihara J, Moriwaki A, Ueno M, Tokunaga T, Arase A, and Honda Y (2004) Cloning, functional analysis and expression of a scytalone dehydratase gene (*SCDI*) involved in melanin biosynthesis of the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Current Genetics* 45: 197-204.
- 9) Kihara J, Moriwaki A, Ito M, Arase, S, and Honda Y (2004) Expression of *THR1*, a 1,3,8-THN reductase gene involved in melanin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, is enhanced by near-ultraviolet radiation. *Pigment Cell Research* 17: 15-23.
- 10) Kihara J, Moriwaki A, Tanaka N, Tanaka C, Ueno M, and Arase S (2008) Characterization of the *BMRI* gene encoding a transcription factor for melanin biosynthesis genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 28: 221-227.
- 11) Kihara J, Watanabe Y, and Honda Y (1999) Suppression and reactivation of UV-inducible sporulation by blue light in *Bipolaris oryzae*. *Mycoscience* 40: 363-366.
- 12) Kihara J, Moriwaki A, Matsuo N, Arase S, and Honda Y. (2004) Cloning, functional characterization, and near-ultraviolet radiation-enhanced expression of a photolyase gene (*PHRI*) from the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Current Genetics* 46: 37-46.
- 13) Moriwaki A, Kihara J, Mori C, and Arase S (2007) A MAP kinase gene, *BMKI*, is required for conidiation and pathogenicity in the rice leaf spot pathogen *Bipolaris oryzae*. *Microbiological Research* 162: 108-114.
- 14) Moriwaki A, Kubo E, Arase S, and Kihara J (2006) Disruption of *SRMI*, a mitogen-activated protein kinase gene, affects sensitivity to osmotic and ultraviolet stressors in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 257: 253-261.
- 15) Kihara J, Moriwaki A, Tanaka N, Ueno M, and Arase S (2007) Characterization of *BLR1* gene encoding a putative blue-light regulator in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 266: 110-118.
- 16) Moriwaki A, Katsube H, Ueno M, Arase S, and Kihara J (2008) Cloning and characterization of the *BLR2*, the homologue of the blue-light regulator of *Neurospora crassa* WC-2, in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Current Microbiology* 56:115-121.
- 17) Kihara J, Tanaka N, Ueno M, and Arase S (2009) Cloning and expression analysis of two opsin-like genes in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* 295: 289-294.
- 18) Ueno M, Imaoka A, Kihara J, and Arase S (2007) Effects of light quality on induction of tryptamine-mediated resistance in lesion mimic mutant of rice infected with *Magnaporthe grisea*. *Journal of Phytopathology* 155: 228-235.
- 19) Arase S, Ueno M, Imaoka A, and Kihara J (2008) Tryptamine pathway-mediated resistance of rice to *Magnaporthe grisea* infection. *Current Topics in Plant Biology* 9: 21-26.
- 20) Imaoka A, Ueno M, Kihara J, and Arase S (2008) Effect of glyphosate on tryptamine production and sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. *Journal of General Plant Pathology* 74: 109-116.

Photoresponse Mechanism in Pytopathogenic Fungi

Junichi Kihara (Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

j-kihara@life.shimane-u.ac.jp