

植物病原糸状菌の近紫外線及び青色光応答における差次的発現遺伝子のプロファイリング

木原淳一^a・中川 強^b

目 的

植物病害の約80%は糸状菌(菌類)によって引き起こされ、これら植物病原糸状菌は主に孢子を形成して種の保存・伝搬を行なっている。多くの植物病原糸状菌の孢子形成は、紫外線または青色光によって誘導・促進されることが明らかとなっているが(本田, 1979), その分子基盤についてはほとんど明らかにされていない。イネごま葉枯病菌は、イネ葉に褐点病斑を形成する植物病原糸状菌であり、本菌の孢子形成は、孢子形成に誘導的に働く近紫外線と、孢子形成に阻害的に働く青色光による拮抗的光反応によって調節されることが明らかとなっている。我々はこれまでに、イネごま葉枯病菌のメラニン合成系遺伝子の発現が近紫外線照射によって特異的に増加することを報告した(Kihara et al., 2004a, Kihara et al., 2004b; Moriwaki et al., 2004)。本研究では、近紫外線及び青色光照射によって差次的に発現が増加する遺伝子を増幅したESTライブラリを構築し、これら遺伝子の塩基配列情報を網羅的に収集・解析するとともに、発現解析を行ない、イネごま葉枯病菌の近紫外線及び青色光応答における差次的発現遺伝子の全体像を明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

イネごま葉枯病菌(*Bipolaris oryzae*) D9/F6-69株を供試菌に用いた。PDA培地で4日間暗黒下培養した菌体に近紫外線(National FL20S・BL-B)または青色光(National FL20S・B-F)を1時間照射した後、菌体からtotal RNAを抽出し、Oligotex-dT30 mRNA Purification Kit (TaKaRa)を用いてmRNAを精製した。コントロールとして、暗黒下培養した菌体を用いた。サブトラクションは、PCR-Select cDNA サブトラクションキット(Clontech)を用いて行ない、得られたPCR産物をpT7 Blue T-Vector (Novagen)にサブクローニングした。PCR産物のシーケンシングは、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)とABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて行なった。BLAST解析は、DNA Data Bank of JapanのWebサイト(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)で行なった。発現解析は、Thermal Cycler Dice Real Time PCR System (TaKaRa)を用いて行なった。暗黒下または近紫外線を1時間照射した菌体から抽出したtotal RNAを用いて、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare)で合成した1本鎖cDNAを実験に供試した。

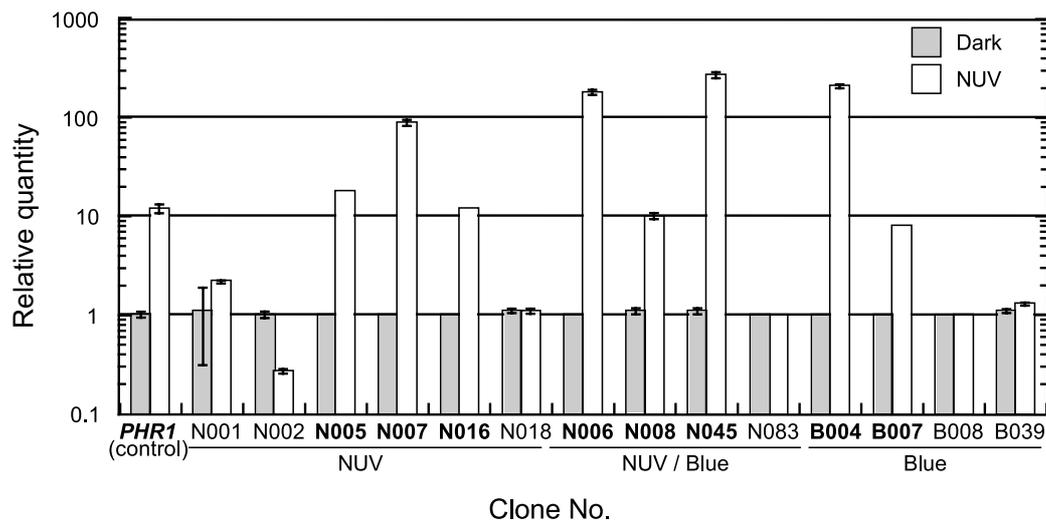


図1 リアルタイムPCRによる遺伝子の発現解析

暗黒下(Dark)または近紫外線照射(NUV)した菌体から抽出・合成したcDNAを実験に用いた。近紫外線照射によって発現が有為に増加したクローン番号を太字で示した。光回復酵素遺伝子(PHR1); NUV照射で得られた候補遺伝子(N001, N002, N005, N007, N016, N018); Blue照射で得られた候補遺伝子(B004, B007, B008, B039); NUV及びBlue照射両方で得られた候補遺伝子(N006, N008, N045, N083)。

a 島根大学生物資源科学部

b 島根大学総合科学研究支援センター・遺伝子機能解析分野

表1 サブトラクション cDNA の BLAST 解析

Clone No.	BLAST match	Organism	Score	Expect	Identities
N001	Patatin-like serine hydrolase, putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	83	3.E-15	62%
N002	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	<i>Aspergillus terreus</i>	115	6.E-25	76%
N005	C2H2 transcription factor	<i>Aspergillus oryzae</i>	116	4.E-25	67%
N007	Hypothetical protein	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	80	4.E-14	58%
N016	Opsin-like protein	<i>Leptosphaeria maculans</i>	59	6.E-08	89%
N018	Monomeric G-protein-like protein	<i>Setosphaeria turcica</i>	100	2.E-20	100%
N006	Opsin-like protein	<i>Neurospora crassa</i>	44	3.E-03	37%
N008	Hypothetical protein	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	107	2.E-22	80%
N045	Conidiation-specific protein-like protein	<i>Magnaporthe grisea</i>	37	2.E-01	37%
N083	ABC transporter, putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	199	3.E-50	81%
B004	ABC multidrug transporter	<i>Aspergillus fumigatus</i>	103	2.E-21	78%
B007	Scytalone dehydratase	<i>Ophiostoma floccosum</i>	55	1.E-06	53%
B008	Transcription factor (Sin3), putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	91	1.E-17	43%
B039	Posttranscriptional regulation nuclease	<i>Aspergillus fumigatus</i>	83	3.E-15	53%

近紫外線照射によって発現が有為に増加したクローン番号を太字で示した。(図1参照). BLAST解析を行ない, 最も相同性の高かったタンパク質 (BLAST match) とその生物名 (Organisms) を示した. Score 値が大きいく程, また Expect 値が小さい程信頼性が高い. Identities は, 比較したアミノ酸配列間での相同性を%で示す. NUV 照射で得られた候補遺伝子 (N001, N002, N005, N007, N016, N018); Blue 照射で得られた候補遺伝子 (B004, B007, B008, B039); NUV 及び Blue 照射両方で得られた候補遺伝子 (N006, N008, N045, N083).

結果及び考察

暗黒処理で発現している cDNA をドライバー, 近紫外線または青色光照射下で発現している cDNA をテスターとしてサブトラクションを行ない, 得られた PCR 産物を pT7 Blue T-vector にサブクローニングし, 差次的遺伝子を選択的に増幅した EST ライブラリを構築した. そして, 近紫外線または青色光照射で特異的に発現していると思われる差次的発現遺伝子のスクリーニングを行なった. その結果, 近紫外線照射で 145 個, 青色光照射で 57 個の独立した候補遺伝子をクローニングした. また, 近紫外線照射と青色光照射で共通に認められた候補遺伝子を 9 個クローニングした (data not shown). また, クローニングしたこれらすべての塩基配列の解析を行なった.

次に, これらの候補遺伝子の中から, 14 個を任意に選び, リアルタイム PCR による発現解析を行なった. リアルタイム PCR には, 各候補遺伝子特異的プライマーを用いた. その結果, 8 個の遺伝子において, 暗黒下と比較した場合, 近紫外線照射によってその発現量が 10~100 倍増加することが明らかとなった (図 1).

BLAST 解析の結果, 近紫外線照射によって発現が増加する遺伝子として, オプシン様タンパク質 (N016, N006), 孢子形成特異的タンパク質 (N045), メラニン合成に関与するタンパク質 (B007), 転写因子 (N005), 細胞内外の物質の輸送に関わる ABC トランスポーター (B004) 等の存在が明らかとなった (表 1).

現在, 近紫外線及び青色光照射によって差次的に発現が増加する遺伝子のスクリーニングと塩基配列の解析を継続して行っており, また, 一部の遺伝子については

詳細な発現解析を行なっている段階である. イネごま葉枯菌の近紫外線及び青色光応答における差次的発現遺伝子の全体像を明らかにすることは, 植物病原糸状菌の光環境応答の分子基盤を解明する糸口になり, ひいては, 新しい病害防除法の開発につながることを期待される.

引用文献

- 本田雄一 (1979) 糸状菌の孢子形成と光条件. 植物防疫 33: 430-438.
- Kihara, J., Moriwaki, A., Ito, M., Arase, S., and Honda, Y. (2004a) Expression of *THR1*, a 1,3,8-trihydroxynaphthalene reductase gene involved in melanin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, is enhanced by near-ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res.* 17: 15-23.
- Kihara, J., Moriwaki, A., Matsuo, N., Arase, S. and Honda, Y. (2004b) Cloning, functional analysis and expression of a scytalone dehydratase gene (*SCD1*) involved in melanin biosynthesis of the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Curr. Genet.* 46: 37-46.
- Moriwaki, A., Kihara, J., Kobayashi, T., Tokunaga, T., Arase, S., and Honda, Y. (2004) Insertional mutagenesis and characterization of a polyketide synthase gene (*PKS1*) required for melanin biosynthesis in *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 1-8.