

特集：ムギ類赤かび病とそれによるマイコトキシン汚染の防除

バイオテクノロジーとムギ類赤かび病の制御

理化学研究所植物科学研究センター 木村 真・安藤 直子・井川 智子・
レメディエーション研究チーム 東海 武史・山口 勇

はじめに

赤かび病菌 (*Fusarium graminearum* や *Fusarium culmorum* などの *Fusarium* 属菌) はコムギやオオムギなどの重要穀類に感染し、収穫に大きな打撃を与える。さらに収量の減少に加え、穀粒中にトリコテセンとゼアラレノンの2種類のマイコトキシンを蓄積させ、食品安全性の観点からも大きな問題を起こす。欧米では1990年代初頭から本菌による重要穀類の被害が続いたことも契機となり、異分野からも多くの研究者が参入して問題解決に取り組んでいる。*Fusarium* 属菌のトリコテセン生合成の分子レベルでの概要は既に解明され (KIMURA et al., 2001), また *F. graminearum* の全ゲノム配列も公開された (<http://www.broad.mit.edu/annotation/>)。ゲノム情報に基づいて、近い将来、生合成遺伝子の全容が明らかになるものと期待される。

トリコテセンの穀粒への混入は、摂取したヒトや家畜に下痢、嘔吐、炎症、ATA症(食中毒性無白血球症)などの中毒症状を引き起こす。特にデオキシニバレノール(DON)は感染穀類に蓄積する主要なマイコトキシンで、食品の安全性の観点から大きな問題として取り上げられた。また、ゼアラレノンはコムギやオオムギでの被害は少ないものの、エストロゲン様作用を有する一種の環境ホルモンであり、ヨーロッパではブタなどの家畜において生殖器官異常を引き起こすなどの被害が出ている。

トリコテセンやゼアラレノンはもともと動物に中毒症状を起こす原因物質として見出されたことから、宿主植物に及ぼす影響についてはさほど注目されなかった経緯がある。しかし、宿主植物に感染する際に何らかの役割を担う病原菌の二次代謝産物(感染因子)として、最近

Inactivation of Virulence Factors in Genetically Modified Cereal Crops: A Possible Solution for the Control of Fusarium Head Blight?
By Makoto KIMURA, Naoko TAKAHASHI-ANDO, Tomoko IGAWA, Takeshi TOKAI and Isamu YAMAGUCHI

(キーワード: トリコテセン, ゼアラレノン, 遺伝子組換え体 (GMO: genetically modified organism), 抵抗性品種育種, 薬剤防除)

いくつかのグループが分子遺伝学的研究を進めている。

本稿ではまずトリコテセンとゼアラレノンを *in vitro* で解毒する二つの遺伝子についてまとめ、その応用の可能性について論じる。次に赤かび病の問題に対し、将来バイオテクノロジーが貢献し得るには何が必要かについて考察する。

I トリコテセン

トリコテセンは酵母や動物など、真核生物のタンパク合成を阻害することから、いくつかの研究グループにより宿主植物にダメージを与えるファイトトキシンとしての役割が想定された。例えば MILLER ら (1986) は、赤かび病抵抗性コムギの品種が DON を分解する活性を有することを示し、このために抵抗性を示していると考察している。しかし DON の分解産物も解毒酵素も同定されず、科学的な根拠は示されなかった。また、病徴の強さとトリコテセンの蓄積量とは相関関係がないこと、トリコテセンの蓄積する時期が感染時期と必ずしも一致しないことから、本毒素の感染因子としての作用に否定的な観察結果も出されていた。後述のように、トリコテセンが赤かび病菌のコムギに対する感染因子であることが科学的に証明されるには、本毒素の生合成研究が進み、分子遺伝学的解析ができるようになるまで、待たねばならなかった。

1 トリコテセンの生合成

トリコテセンはファルネシルピロリン酸から2度の環化反応を経て生成するセスキテルペンで(図-1)、*Fusarium* 属菌はC-3位が水酸化されたトリコテセンを生産する。HOHN らはT-2 toxin生産菌 *Fusarium sporotrichioides* から生合成経路の最初のステップを触媒する酵素トリコジエンシンターゼを精製し、コードする遺伝子 *Tri5* を単離した。さらに他のいくつかのトリコテセン生合成遺伝子とともにクラスターを形成していることを示し (HOHN et al., 1993), 本遺伝子クラスターの概要が明らかになった (BROWN et al., 2001)。

こうした中で我々は、トリコテセン骨格のC-3位のアセチル化が *in vitro* でタンパク合成阻害活性を喪失さ

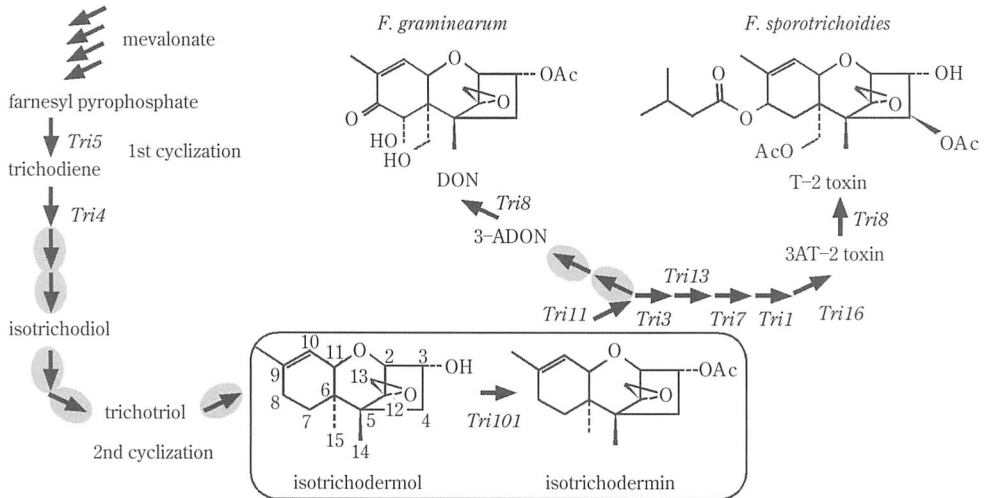


図-1 トリコテセン生成の概要

Fusarium 属のトリコテセン生成経路。Tri5を含む遺伝子クラスターにはTri1, Tri16, Tri101以外の生成遺伝子が存在する (KIMURA et al., 2003b)。影付きの矢印のステップにかかわる生成遺伝子は単離されておらず、そのゲノム上での存在様式 (分散しているのか、残りの遺伝子が集まって別のクラスターを形成しているのか) については未知である。略語 (DON, deoxynivalenol; 3-ADON, 3-acetylDON; 3-AT-2 toxin, 3-acetylT-2 toxin)。

せる (ただし動物に摂取させると、C-3位のアセチル基は消化中に外れたりするため毒性を有する) ことを見出した。DONやT-2 toxinの生合成では、トリコテセン骨格生成後、直ちにC-3位がアセチル化され (図-1でisotrichodermolからisotrichoderminへの変換)、最終ステップの一つ手前までこのアセチル基は外れることがない。このことは、トリコテセン生産菌にとって、C-3位アセチル化酵素遺伝子は、自己耐性のための役割を果たすことを意味する。そこで、我々は分裂酵母を宿主にした*F. graminearum*のcDNA発現クローニングを行い、T-2 toxinに耐性を示すコロニーからC-3位アセチル化酵素遺伝子Tri101を単離した (KIMURA et al., 1998a)。Tri101を組換えタバコで発現させると、予想どおり強い生育阻害活性を有するトリコテセン4,15-diacetoxyscirpenol (DAS) に対して耐性を示すようになる (MUHTCH et al., 2000)。

このTri101はトリコテセン生合成遺伝子クラスターには入っておらず、他の経路遺伝子とは異なる起源をもつことが示された (KIMURA et al., 1998b)。また、最近本耐性遺伝子はトリコテセンを生産しない他の*Fusarium*属菌からも見出され (KIMURA et al., 2003a)、遺伝子の進化的観点からはトリコテセン生産菌の自己耐性というより、むしろ一般的な薬剤耐性遺伝子として真核生物に広く存在することが示唆された。

2 感染因子としてのトリコテセン

トリコテセンが赤かび病菌の感染時に何らかの役割を果たす感染因子であるかどうかを科学的に証明するためには、本毒素を生産しないという点以外のすべての点において、野生株と同一の形質をもつトリコテセン非生産変異株を作出し、その病原性を評価する必要がある。変異剤処理やUV照射で作出したトリコテセン非生産株では、ゲノムのどの位置に変異が入ったのかは明らかでなく、トリコテセン生産性以外の形質との相乗効果をみている可能性が排除できない。トリコテセンのみの役割を調べるためにはターゲティングによる生合成遺伝子の特異的な破壊株が必要である。1990年代に入ってTri5などの生合成経路遺伝子が取得され、同時に*Fusarium*属菌の遺伝子導入系も確立し、トリコテセンの役割の検証が可能となった。

米国農務省の研究グループはTri5を特異的に破壊した*Fusarium sambucinum*のDAS非生産性変異株を作出し、本変異株のアメリカカボウフウに対する病原性が低下することを示した (DESJARDINS et al., 1992)。これはトリコテセンが宿主植物に感染するうえで、感染因子としての役割を担っていることを証明した初めての例である。また、同様に作出された*F. graminearum*のDON非生産性変異株を用いた接種検定から、トリコテセンを生産できないとコムギに対する病原性が低下することも実証された (PROCTOR et al., 1995)。以上のようにトリコテセ

ンは感染因子として宿主植物に対する病原性にある程度寄与しており、腐生菌的な性質を有する赤かび病菌の防除ではその活性を失活させることが病徴の軽減に役立つものと考えられた。

最近、*Tri101* をトウモロコシのユビキチン遺伝子プロモーターにつないだ遺伝子組換えコムギが作出された。温室内での感染実験では赤かび病菌に対する病徴が軽減され (OKUBARA et al., 2002), トリコテセンの感染因子としての作用が裏付けられている。ただし、実際の野外での抵抗性強度や形質の安定性など、必ずしも実用に資するものではなく、単一の感染因子を失活させるだけでは十分な赤かび病耐性は得られないのが現実のようである。

II ゼアラレノン

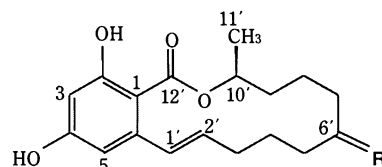
ゼアラレノンの生合成に関する本格的な分子レベルでの研究は行われていないが、¹³C ラベル酢酸の取り込み実験から、九つの酢酸ユニットが head to tail に縮重した典型的なポリケタイドであることが知られている (BLACKWELL et al., 1985)。最近 *F. graminearum* の全ゲノム配列が公開されたが、このデータベースの *in silico* 解析によると、ポリケタイドシンターゼ遺伝子は 15 個存在しており、ゼアラレノン生合成の経路遺伝子はこれらのいずれかであると考えられる。今後はゲノム情報を有効に利用して、ゼアラレノンの生合成も分子レベルでの解明が行われるであろう。

ゼアラレノンの植物に対する毒性は、一部の報告 (McLEAN, 1995) を除いては、一般には認知されていない。しかし、最近オーストリアの HAUSER らの研究グループは、ゼアラレノンが根の細胞壁構造を乱し、防御関連遺伝子の発現に至るまでの情報伝達系を抑える感染因子であることを示す結果を得ており、DNA マイクロアレイによる詳細な遺伝子発現解析を進めている (http://www.boku.ac.at/zag/AG_hauser.htm)。

1 ゼアラレノン解毒する酵素とその遺伝子

我々はゼアラレノン解毒する微生物を探索し、糸状菌 *Clonostachys rosea* が図-2 に示すようにゼアラレノンのラクトン環を加水分解・脱炭酸することを見出した。ヒト乳癌培養細胞を用いた評価系において、ゼアラレノンの分解物にはエストロゲン活性が検出されなかった (KAKEYA et al., 2002)。そこで、我々は本菌から解毒酵素を精製して、コードする遺伝子 *zhd101* を取得した (TAKAHASHI-ANDO et al., 2002)。

解毒酵素 ZHD101 は至適 pH が 10 前後と高く、また分子活性 (k_{cat}) も 1 に満たない非効率的な酵素であつ



substrate	1', 2'	R	relative estrogenicity
zearalenone	trans	O	1
α -zearalenol	trans	H, α -OH	92
β -zearalenol	trans	H, β -OH trans	0.44
zearalanone	dihydro	O	2.5
α -zearalanol	dihydro	H, α -OH	18
β -zearalanol	dihydro	H, β -OH trans	3.5

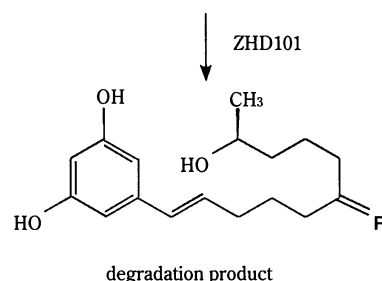


図-2 ゼアラレノン (およびその類縁体) の ZHD101 酵素による解毒
すべてのゼアラレノン類縁体が ZHD101 酵素の基質となり得るが、概して分子活性 k_{cat} (= approx. 0.5) の値は低い。 β -zearalenol は他の基質に比べて特に低い k_{cat} (= 0.075) を示す。

た。このように効率の低い酵素の遺伝子を導入した組換え体が実際にゼアラレノンの解毒に役立つかどうかを調べるために、N 末端に EGFP をつないだ EGFP::ZHD101 融合酵素を作成した。この融合酵素は各種ゼアラレノン類縁体に対する k_{cat} および K_m 値がもとの解毒酵素と同様の値を示した。さらに融合酵素の蛍光とゼアラレノン分解酵素活性は、偶然、すべての pH 領域で正の相関性を示したことから、蛍光強度が解毒活性のマーカーになることがわかった。そこで、組換え体でのゼアラレノン解毒の可否を効率的に評価するのに際し、まず融合遺伝子 *egfp::zhd101* を用いて蛍光強度 (= 解毒活性) をモニターしながら調査することにした。

2 組換え体によるゼアラレノンの解毒

出芽酵母に *egfp::zhd101* を導入し、蛍光強度を指標に形質転換体の中でゼアラレノン分解活性の最も高い形質転換体を選抜した。2 $\mu\text{g/ml}$ のゼアラレノン含有培地中に組換え体を植菌し、ゼアラレノンおよび類縁体の濃度を 4 日間測定した。基質ゼアラレノンに対し、酵母がも

ととも有する C'-6 位のケトを還元して β -ゼアラレノールを生じさせる活性 (BÖSWALD et al., 1995) と形質転換体の解毒活性が競合するが、 β -ゼアラレノールはゼアラレノンの類縁体の中で ZHD101 の基質としては最も適していない。このため酵母に添加させた際に一部生じた β -ゼアラレノールが分解されずに残った。しかし、75% のゼアラレノンは分解されたことから、相対的エストロゲン活性は 11% に低下した (図-2 参照)。すなわち、ZHD101 は代謝回転速度の低いアルカリ至適の酵素であるにもかかわらず、組換え微生物を用いた食品や飼料の解毒に利用できることを示している。酵母での発現レベルを上げるためにコドンの使用を至適化した合成遺伝子や β 還元活性のない食品グレードの微生物 *Lactobacillus* (EL-NEZAMI et al., 2002) を宿主に用いることによって、ゼアラレノンの完全解毒系の確立が可能になるであろう。

また、モデル穀類であるイネにも *egfp::zhd101* を導入し、蛍光活性を指標としてゼアラレノン分解活性の強い組換えカルスを選択した。1 $\mu\text{g/ml}$ のゼアラレノン濃度の培地 (pH 6.2) 中で 1 週間培養したところ、最も活性の強いカルスでは完全にゼアラレノンを分解できることが示された。これは酵母の場合とは異なって、穀類では C'-6 位の β 還元活性がなく、さらにコドンが穀類での発現に適しているためと考えられる。*zhd101* を再生植物個体の穀粒の部分で発現させるとどれくらいの量のゼアラレノンまで解毒できるか、また、病原性に関与する因子であれば *zhd101* を発現する組換え体は病原菌に対して抵抗性が增大するのかなど、今後明らかにしなくてはならない。

III その他の病原菌の感染因子

植物病原菌が宿主植物を攻撃する際に、様々な細胞壁分解酵素を分泌することが古くより知られている (WALTON, 1994)。植物はこれらの病原菌の細胞壁分解酵素に対し、阻害タンパクを分泌する。最もよく研究されている例は、双子葉植物のポリガラクトナーゼ (PG) 阻害タンパク (PGIP) であり、多くの植物から遺伝子が単離され、進化や発現に関して解析が進められた。また、PGIP と PG との結合の立体構造も解析された (DE LORENZO et al., 2001)。PGIP はその LRR (ロイシンに富んだ繰り返し配列で、例えば植物の *R* 遺伝子産物では、非病原性因子の認識・結合にかかわる) の構造を介して PG に結合して阻害する。この LRR の外側 (溶媒側) の領域のアミノ酸が結合の特異性を決定する重要な位置で (LECKIE et al., 1999)、病原菌の PG を認識できるように

遺伝子が適応進化してきたことが示唆されている。

一方、ペクチン含量の低い穀類の細胞壁のヘミセルロース主成分はアラビノキシランであり、穀類の病原菌にとっては PG よりもキシラナーゼ (XLN) の方がより重要な役割を示すと考えられる。しかし、XLN を阻害する宿主植物の因子は、XIP ファミリーと TAXI ファミリーの阻害タンパクが小麦粉より見出されるまで知られていなかった。最近、ようやくこれらそれぞれのファミリーから、*xip-1* (ELLIOTT et al., 2002) および *taxi-1* (FIERENS et al., 2003) 遺伝子がクローニングされた。

我々は *taxi* が病害抵抗性に関与するかどうかを調べるため、*taxi-1* の発現様式を RT-PCR で調べた。胚では *taxi-1* の発現が確認できたが、根では *taxi-1* と配列が異なるバリエーション (核酸レベルでの相同性が 90% 程度) の存在が確認できた。これらのうち、発現量の多い二つのクローンを *taxi101* および *taxi102* と名付け、その全長を RACE 法により取得した。配列解析の結果、*taxi101/102* は *taxi-1* に比べてアミノ酸置換を起こす核酸の置換の割合が高く (non-synonymous/synonymous > 1)、*R* 遺伝子産物や PGIP のように病原菌側の因子と直接相互作用する場合にみられる適応進化を遂げてきたことが明らかとなった。すなわち、*taxi101/102* は病原菌の分泌する XLN を阻害し、その攻撃を防御するための役割を果たしていることが示唆された。また、*taxi-1* は主に胚、*taxi101/102* は根と感染組織で発現し、*taxi101/102* は傷によっても誘導されることが示された。エチレン誘導性の *PR* 遺伝子は健全な根でも病原菌の侵入に備えて構成的に発現していることが知られている (VÖGELI-LANGE et al., 1994)。これらの発現パターンを総合すると、*taxi101/102* 遺伝子は、病原菌の XLN を阻害することによって抵抗性の一部を担っていることが予想される。赤かび病菌の全ゲノムが明らかになったことから今後、どの XLN が病原性に寄与しており、どの TAXI バリエーションがその感染因子を阻害しているか、といった生化学レベルからのアプローチが可能になろう。

おわりに

赤かび病耐性をムギ類に付与するために、病原菌を直接攻撃する細胞壁分解酵素や抗菌性タンパクの遺伝子が着目され、組換えコムギやオオムギで構成的に発現させてその抵抗性への寄与が評価されている (DAHLEEN et al., 2001)。しかし実際には温室内ではある程度の抵抗性を示しても野外では全く病徴が軽減されず、とても実用化できるものではない (ANAND et al., 2003)。本稿で述べてきた候補感染因子を不活化させる 3 種類の遺伝子を含

め、赤かび病に抵抗性を付与するためには、これらいくつもの遺伝子を組み合わせた協調的な効果が必要であろう。また、世代を経るうちに目的遺伝子の発現が抑えられるサイレンシングなど、クリアーしなくてはならない問題もある。このように、除草剤耐性のダイズや害虫耐性のトウモロコシとは異なり、バイオテクノロジーを利用した赤かび病抵抗性コムギやオオムギの作出には、まだ遠い道のりがあるといえる。

今後、実際に役立つ赤かび病耐性の組換えムギ類を実用化するためには、1コピーの遺伝子を安定に染色体上に組み込んで保持する技術の確立、効果的な抵抗性遺伝子資源候補の探索と開発、GMO (Genetically modified organisms) に対するパブリックアクセプタンスの確立が不可欠である。しかし、現実の赤かび病の防除策としては、迅速な病害の診断と原因菌の同定、効率的な薬剤散布による防除、抵抗性系統の育種、地域の実情に最も適した散布方法や薬剤の選択など、従来の地道で確固たる方法が最も重要で欠かせないのはいまでもなからう。

謝 辞

本稿執筆の機会を与えて下さった中央農業総合研究センター糸状菌病害研究室の小泉信三室長に厚くお礼申し

上げる。

引 用 文 献

- 1) KIMURA, M. et al. (2001) : J. Gen. Appl. Microbiol. 47 : 149 ~ 160.
- 2) MILLER, J.D. and P.G. ARNISON (1986) : Can. J. Plant Pathol. 8 : 147 ~ 150.
- 3) HOHN, T.M. et al. (1993) : Curr. Genet. 24 : 291 ~ 295.
- 4) BROWN, D.W. et al. (2001) : Fungal Genet. Biol. 32 : 121 ~ 133.
- 5) KIMURA, M. et al. (1998a) : J. Biol. Chem. 273 : 1654 ~ 1661.
- 6) MUHTICH, M.J. et al. (2000) : Plant Sci. 157 : 201 ~ 207.
- 7) KIMURA, M. et al. (1998b) : FEBS Lett. 435 : 163 ~ 168.
- 8) ——— et al. (2003a) : Genetics 163 : 677 ~ 684.
- 9) DEAJARDINS, A. E. et al. (1992) : Mol. Plant-microbe Interact. 5 : 214 ~ 222.
- 10) PROCTOR, R.H. et al. (1995) : ibid. 8 : 593 ~ 601.
- 11) OKUBARA, P.A. et al. (2002) : Theor. Appl. Genet. 106 : 74 ~ 83.
- 12) BLACKWELL, B.A. et al. (1985) : J. Biol. Chem. 260 : 4243 ~ 4247.
- 13) McLEAN, M. (1995) : Mycopathologia 132 : 173 ~ 183.
- 14) KAKEYA, H. et al. (2002) : Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 : 2721 ~ 2724.
- 15) TAKAHASHI-ANDO, N. et al. (2002) : Biochem. J. 365 : 1 ~ 6.
- 16) BÖSWALD, C. et al. (1995) : Nat. Toxins 3 : 138 ~ 144.
- 17) EL-NEZAMI, H. et al. (2002) : Appl. Environ. Microbiol. 68 : 3545 ~ 3549.
- 18) WALTON, J.D. (1994) : Plant Physiol. 104 : 1113 ~ 1118.
- 19) DE LORENZO, G. et al. (2001) : Annu. Rev. Phytopathol. 39 : 313 ~ 335.
- 20) LECKIE, F. et al. (1999) : EMBO J. 18 : 2352 ~ 2363.
- 21) ELLIOTT, G.O. et al. (2002) : FEBS Lett. 519 : 66 ~ 70.
- 22) FIERENS, K. et al. (2003) : ibid. 540 : 259 ~ 263.
- 23) VÖGELI-LANGE, R. et al. (1994) : Plant Mol. Biol. 25 : 299 ~ 311.
- 24) DAHLEEN, L. et al. (2001) : Crop Sci. 41 : 628 ~ 637.
- 25) ANAND, A. et al. (2003) : J. Exp. Bot. 54 : 1101 ~ 1111.
- 26) KIMURA, M. et al., (2003b) : FEBS Lett. 539 : 105 ~ 110.

書 評

拮抗微生物による作物病害の生物防除
—我が国における研究事例・実用化事例—
百町満朗 監修 B5版 245ページ
定価 5,250円 (本体 5,000円+税)
発行 クミアイ化学工業株式会社
制作・発売 全国農村教育協会 2003年8月

クミアイ化学工業株式会社がトリコデルマ・アトロピリデ水和剤エコホープの登録を2003年1月28日に取得、その上市販売を記念して発行されたのが本書である。

監修に当たった岐阜大百町教授は、我が国における生物防除研究の現状が一目瞭然になるように、現在我が国で取り組まれている拮抗微生物を用いた作物病害防除の研究事例・実用化事例を網羅的に紹介することを目的にして、本書の編集に当たられたようである。

近年、世界的なレベルで環境負荷の影響が少ない生態系保全型の病害防除の必要性が強く要望される中で、微生物農薬の開発が進められており、既にいくつかの商品として上市販売されるようになった。エコホープもその一つである。このような微生物農薬の開発に当たっては、

有用な微生物の選抜はもちろんであるが、これまでの化学合成農薬とは異なった技術的な問題、すなわち微生物をいかに有効に利用するか、その技術が開発されない限り実用化に至らない。このようなことから本書では、現在まで取り組まれてきた拮抗微生物を用いた作物病害防除の研究事例および実用化の事例を余すことなく紹介することを目的として、この問題に携わる第一線の研究者25名が分担執筆している。

内容は細菌・放線菌による生物防除と糸状菌による生物防除に大別され、これまでに我が国で取り上げられた拮抗微生物ごとに、選抜の経過、対象とする病害防除の機作、防除効果について実用化をポイントにおいて紹介されている。また共通する問題として、生物防除の史的評論、拮抗微生物による病害防除のメカニズム、微生物農薬の開発、生物防除研究の将来展望についても詳細に述べられている。したがって、本書をめくれば、我が国における拮抗微生物による作物病害防除の現状と展望のすべてを知ることができる好著である。苦勞して開発・上市された微生物農薬も使用方法が的確でないため、十分な効果が発揮できず評価を落とすことがないよう切望するが、そのためにも、作物病害防除に従事するすべての関係者に一読をすすめるたい有益な本である。

(梶原敏宏)