

微生物代謝制御研究ユニット

Plant & Microbial Metabolic Engineering Research Unit

ユニットリーダー 木村 真
KIMURA, Makoto

Fusarium graminearum (ムギ類赤かび病菌)や *Fusarium sporotrichioides* 等のフザリウム属菌は、多様な側鎖構造を有するトリコテセン系毒素やゼアラレノン等のマイコトキシン(かび毒)を生産する。トリコテセンの側鎖多様性を生み出す遺伝的メカニズムや生合成遺伝子の発現制御は未だ明らかにされておらず、またゼアラレノンに関しては生産菌の遺伝学的な研究は殆ど何もなされていない。本研究ユニットでは、未同定のトリコテセン生合成遺伝子を単離し、後期生合成経路を決定することを目指して研究を行うと同時に、マイコトキシンを代謝・解毒する遺伝子を利用した天然毒素低減化について検討している。さらに、セスキテルペン毒素トリコテセンの生合成において、*F. graminearum* が前駆体物質の供給量を巧妙に調節・制御する機構の解明を行なうことによって、希少生理活性物質を大量に供給する技術基盤の構築に取り組んでいる。これらの研究を通じて得られる知見は、植物の有用代謝産物の生合成に関わる遺伝子資源を利用することによって、様々な稀少有用化合物や新規化合物を創出する有用糸状菌の開発につながる事が期待される。

1. トリコテセン生合成に関する研究

(1) *Fusarium graminearum* の二次代謝制御に及ぼす浸透圧応答情報伝達系構成因子の関与(木村, 落合^{*1}, 東海^{*1})

前年度、*F. graminearum* の生育に影響を与えない低濃度(1・2%)の NaCl を培地中に添加すると、トリコテセンの生産が抑制されることを明らかにしている。そこで、浸透圧情報伝達系、特に Hog1 経路の mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードを構成する遺伝子 *FgOs4* (MAPKKK)、*FgOs5* (MAPKK)、*FgOs2* (MAPK)、がトリコテセン生合成を負に制御していると予想し、上流のセンサーヒスチジンキナーゼ遺伝子 *FgOs1* とともに一連の遺伝子破壊体を作成して本菌の二次代謝に及ぼす影響を解析した。予想に反して、*FgOs4*、*FgOs5*、*FgOs2* の各破壊体ではそれぞれトリコテセン生産量が低下していた。ソルビトール処理によるトリコテセン生産への影響を調べてみたところ影響が見られないことから、結局塩ストレスによって毒素生産が抑制されていることが判明した。また、*F. graminearum* はトリコテセン以外にもポリケチド赤色色素オーロフザリンを生産するが、MAPK カスケードの遺伝子を破壊すると赤色色素の生産量が著しく増大すること、逆に *FgOs1* を破壊すると赤色色素の生産量が減少することが偶然見出された。以上の結果から、浸透圧応答情報伝達系構成因子が様々な二次代謝の制御にも関与していることが示唆された。

(2) *Tri4* 遺伝子をターゲットとした毒素産生抑制剤スクリーニング系の確立(木村, 東海^{*1}, 安藤^{*1})

前年度に明らかにした *Tri4* 遺伝子の機能に基づき、本遺伝子をターゲットとした毒素産生抑制剤のスクリーニング系を確立した。出芽酵母に *Tri4* 遺伝子を発現誘導させ、阻害剤候補物質(flavone や furanocoumarin)で組換え酵母を処理し、直後に基質アナログ trichodiene-11-one を加えて6時間震盪培養した。ヘキサン抽出した画分を HPLC の逆相カラムで分離し、生じる 2 α -hydroxytrichodiene-11-one の量を 254 nm の吸光度でモニターすることによって、阻害剤の強さを定量化することができた。本系を用いて市販のカテキン系飲料ヘルシア緑茶やカテキンサプリメント 300 等に、*F. graminearum* の毒素産生を阻害する活性を見出す事ができた。

2. コムギの新しい XIP 型キシラナーゼ阻害剤の同定と解析

(1) *Xip-R1* 遺伝子の単離と解析(木村, 安藤^{*1})

穀類の XIP 型のキシラナーゼ阻害剤は glycoside hydrolase family 18 (GH18) に属し、植物 class III キチナーゼと相同性を示す。これまで六倍体パンコムギにおいては、XIP-I が唯一、遺伝子発現が確認されたファミリーメンバーであったが、他のメンバーは、発現が極めて低い *Xip-III* しか知られていなかった。そこで degenerate primer を用いた PCR によって、核酸レベルでの相同性が低く、サザン解析で検出の難しい他の XIP 型ファミリーを探索したところ、タンパクレベルで 57% の相同性を示す *Xip-R1* を根の cDNA から見出すことができた。組換え大腸菌から精製した XIP-R1 は family 11 キシラナーゼを阻害し、また C 末端側に EGFP を融合させたタンパクが植物細胞間隙へ分泌されていることから、病原菌の防御応答に関与していることが示唆された。*Xip-R1* には核酸レベルでのホモロジーが高い少なくとも 11 個のホモログが存在したが、様々な組織、条件下で主に発現が見られたのは *Xip-R1* の他には *Xip-R2* のみであった。葉に感染するうどんこ病菌(*Erysiphe graminis*)に対しては、*Xip-R1* のみ発現誘導が観察されたが、穂に感染する赤かび病菌(*F. graminearum*)に対しては全ての *Xip-R* 遺伝子ファミリーの発現誘導は起こらなかった。以上の結果から、パンコムギのゲノムには多数の XIP 型キシラナーゼ遺伝子があるが、それらのうち限られた遺伝子が限られた組織である特定の病原菌の防御応答に関わっていることが示された。

*1 協力研究員

Plants and microorganisms are a source of bioactive metabolites, which comprises of both harmful and beneficial compounds for human beings. We are currently studying the biosynthesis of trichothecenes and detoxification of zearalenone, which are produced by *Fusarium graminearum*. We are also studying regulatory mechanisms of fungal sesquiterpene biosynthesis, focusing on the metabolic flow from the common intermediate compound. The research is expected to provide a new technological platform to produce large quantities of valuable compounds in the future. Metabolic engineering of the filamentous fungi will contribute to develop a repository of new bioactive compounds using plant gene resources.

1. Biosynthesis of trichothecenes

(1) Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum produces trichothecenes in aerial hyphae, a process which is markedly suppressed by NaCl without a significant effect on fungal growth. Here we report on the involvement of kinases of the two-component osmotic signal transduction pathway in the regulation of secondary metabolism in *F. graminearum*. While a deletion null mutant of *FgOs1* (encoding the osmosensor histidine kinase) ($\Delta FgOs1$) produced a reduced amount of the red pigment aurofusarin and was unaltered in its ability to produce trichothecenes, deletion null mutants of *FgOs4* (encoding mitogen-activated protein kinase kinase; MAPKKK), *FgOs5* (MAPKK), and *FgOs2* (MAPK) showed markedly enhanced pigmentation and failed to produce trichothecenes in aerial hyphae. Also, the transcript levels of *PKS12* and *GIP2* (aurofusarin biosynthetic pathway and regulatory genes, respectively) were significantly enhanced in the $\Delta FgOs4$, $\Delta FgOs5$, and $\Delta FgOs2$ mutants and were reduced in the $\Delta FgOs1$ mutant. In addition, expression of *Tri4* and *Tri6* (trichothecene biosynthetic pathway and regulatory genes) and production of trichothecenes in rice medium were markedly reduced in the former three protein kinase mutants. This is the first report demonstrating the involvement of a MAPK in the regulation of secondary metabolism.

(2) A screening system for inhibitors of trichothecene biosynthesis: hydroxylation of trichodiene as a target
Fusarium Tri4 encodes a key cytochrome P450 monooxygenase for hydroxylation of trichodiene early in the biosynthesis of trichothecenes. In this study, we established a system for screening for inhibitors of trichothecene biosynthesis using transgenic yeast expressing *Tri4*. For easy evaluation of the TRI4 activity, trichodiene-11-one was used as a substrate, and the formation of 2 α -hydroxytrichodiene-11-one was monitored at 254 nm in an analysis with HPLC. Using this system, TRI4 proved to be inhibited by various flavones and furanocoumarins. We also found that a catechin-containing commercial beverage product, Catechin Supplement 300 (CS300), inhibited TRI4 activity, at which concentration the growth of the transgenic yeasts was not significantly affected. At an early stage of culture, both flavone and CS300 exhibited a toxin-inhibitory activity against *Fusarium graminearum*. However, inhibition of trichothecene production was not observed with longer incubation periods at minimum concentrations necessary to inhibit > 50% of the TRI4 activity, presumably due to the metabolism by the fungus. The results suggest that this yeast screening system with TRI4 is useful for the rapid identification of lead compounds for the design of trichothecene biosynthesis inhibitors that are resistant to modification by the fungus.

2. Identification of multiple highly similar XIP-type genes in hexaploid wheat

(1) Cloning and characterization of *Xip-R1*

In hexaploid wheat, *Xip-I* is the only XIP-type xylanase inhibitor gene whose expression and function have been characterized in detail. Here we demonstrate the existence of new XIP-type genes with the identification of *Xip-R1* and *Xip-R2* in the root cDNAs. Southern blot analysis with the *Xip-R1* probe revealed that XIP-type genes comprised a significantly greater gene family than previously speculated on in studies with the *Xip-I* probe. The transcript level of *Xip-R* genes was increased upon an inoculation with *Erysiphe graminis* in the leaves, but not with *Fusarium graminearum* in the spikelets. RT-PCR with the RNA samples followed by extensive sequencing of the cloned amplified products revealed the presence of 12 highly similar *Xip-R* genes. Among these genes, *Xip-R1* was the only predominant *Xip-R* family member induced to express in response to *E. graminis*. *Xip-R1* was located in the apoplastic space and inhibited family 11 xylanases, but the protein did not show chitinolytic activity. These results suggest that hexaploid wheat has a large family of XIPs in its genome, but that only some of them are expressed for plant defense in limited tissues.

Staff

Head

Dr. Makoto KIMURA

Members

Dr. Noriyuki OCHIAI*

Dr. Takeshi TOKAI*

* Contract Researcher

Trainees

Mr. Hyodo Soichiro (Fac. Sci. Technol., Tokyo Sci. Univ.)