

イネいもち病菌を用いた薬剤標的分子解析法によるロキシスロマイシンの
真核生物における作用点の探索

東京理科大学大学院 理工学研究科
応用生物科学専攻 博士後期課程
鎌倉研究室 石井 晶

要旨

新規薬剤の開発は、リード化合物を天然物から単離する手法が主流であったが、有用なリード化合物は減少傾向にある。そこで、近年はヒトゲノムの解読やケミカルライブラリーの構築などによりコンピュータによる化合物のデザインや化合物の構造から標的を推定する等、新たな手法での創薬が広がりを見せている。これにより効率に医薬品の開発が進むことが期待されていたが、現在も新薬開発には莫大な費用が必要であり、開発は難航している。そこで、すでに医薬品として使用されており、安全性が確認できている既存の薬剤を利用した新薬の開発が注目されつつある。例えば、免疫抑制剤として使用されているシクロスポリンに C 型肝炎抑制作用が見出され、シクロスポリンに似た構造のより抗 C 型肝炎抑制効果の高い薬剤が開発されている。他にも、リファンピシンは原核生物の RNA 合成阻害作用が知られているが、作用点未同定の血管新生抑制作用等の抗癌作用も報告されている。このように、既存の薬剤に新たな薬効が発見される場合だけでなく、現在治療に用いられている薬の中にも作用機序が不明な有用な作用が存在している場合も少なくない。ヒトに対する治療薬だけでなく農薬等もヒトに対する副作用や環境負荷の少ないものが求められており、知見の多い既存薬の応用は有用であると考えられる。より効果の高い薬剤の開発や安全性の根拠にもなる作用機序の解明といった薬剤の研究開発に作用点の特定は重要な役割を担うことから、より効率の良い作用点解析手法の開発が必要とされている。本研究では、真菌であるイネいもち病菌に対する細胞分化抑制作用の指標とし、分子間相互作用解析系として非常に感度の高いフェージディスプレイ法を薬剤の標的候補分子の探索に用いた。この手法は、1 つの解析系で様々な化合物の解析ができ、イネいもち病菌に対する阻害効果を調べるため、真菌に対する新たな薬効を発見できる可能性がある。また、これまでの手法では解析困難であった弱い結合まで解析できるという利点がある。

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) はイネに深刻な被害をもたらす植物病原菌であり、植物病原菌のモデル生物でもある。イネいもち病菌は、感染時に宿主体上で孢子 (分生子) から発芽管を伸長させ、その先に付着器と呼ばれるドーム状の器官を分化させることで植物体内に侵入する。この付着器形成は 1 細胞の比較的単純な細胞分化であり、付着器が形成される際に細胞分裂を伴う。細胞分化や細胞分裂には多くの遺伝子が関与しており、代謝異常や部分的な DNA 合成阻害など様々な要因でイネいもち病菌の付着器形成は阻害される。そのため、化合物が真核生物に対し生理活性作用を持つかということ付着器形成阻害効果を指標に調べることができる共に、付着器分化は感染特異的器官であるため付着器分化阻害の標的が解析できれば抗いもち薬や抗真菌剤へ応用できると考えた。また、付着器形成は疎水性の人工固体基質上でも誘導できるため、比較的簡便に薬剤の影響を調べることができるという利点がある。そこでまず、既存の薬剤の新たな効用や真核生物に対する作用点の有無を解析することを目的に複数の化合物についてイネいもち病菌の付着器分化に対する作用を調べた。その結果、今回調べたマクロライド系抗生物質のほとんどで付着器分化阻害効果が見られた。その阻害効果は 14 員環のものでは比較的強く、16 員環のものでは弱いか効果がないという結果であった。これは抗炎症作用等真核生物で見られていたマクロライド系抗生物質における未解明の作用と傾向が一致していた。そのため、

イネいもち病菌における作用点だけではなく真核生物に共通する作用点が解析できる可能性が考えられた。今回調べたマクロライド系抗生物質の中で付着器分化抑制作用が強く、治療薬として使用されているロキシスロマイシン (RXM) に注目し、イネいもち病菌を用いて解析を行った。RXM は 14 員環マクロライド系抗生物質であり、原核生物のタンパク質合成阻害剤として知られる。一方で真核生物であるヒトやマウスなどにおいて炎症性サイトカインの抑制や血管新生抑制、消化管運動機能亢進作用といった作用が報告されている。しかし、真核生物に対しては、RXM がモチリンのアゴニストとして消化管運動機能亢進に関与する以外作用機序はほとんど解明されていない。今回、イネいもち病菌に対して付着器分化阻害という新たな作用が見出せた。この作用点を解析できれば抗いもち病菌薬や抗真菌剤への応用やイネいもち病菌の付着器分化機構解明に貢献できると考えた。また、もし真核生物で共通の作用点を有しているなら新薬開発にも非常に有用であると考え、RXM の分子標的の探索を行った。

標的分子探索には T7 フェージディスプレイ法を用いた。フェージディスプレイ法はフェージに DNA ライブラリーを導入し、外殻に様々なペプチドを提示させ、薬剤などと結合したフェージを選抜、増幅させることで特定の分子と相互作用するペプチドを検出する方法である。そのため、1 分子のフェージからでも大腸菌を用いて増幅させることができるため非常に感度に優れている。さらに、イネいもち病菌はゲノム内に非コード領域が少ないため、cDNA の代わりにゲノム断片をライブラリーとして使用することができた。ゲノムライブラリーは、すべての遺伝子がほぼ偏りなく含まれているため、cDNA を用いる際問題となる特定の時期にのみ発現している遺伝子や発現量の少ない遺伝子も解析できるという利点がある。T7 フェージディスプレイ法による解析により、RXM の標的候補タンパク質として、いもち病菌機能未知タンパク質や DNA ポリメラーゼなど 4 つの候補分子が得られた。その中の 1 つに真核生物で広く保存されている CDC27 のホモログと推定された遺伝子 *PoCDC27* があった。*PoCdc27* について機能解析は行われていなかったが、ヒトや酵母などにおいて CDC27 は有糸分裂後期のチェックポイントを担っているユビキチンリガーゼ anaphase promoting complex (APC) を構成するサブユニットの 1 つとして知られている。イネいもち病菌において *PoCDC27* の発現量を RT-PCR により解析したところ、付着器形成時に強く発現していることが分かった。RXM は付着器形成を抑制したことから標的分子は付着器形成時に発現していることが考えられ、さらに付着器分化には細胞分裂が関与することから *PoCdc27* はイネいもち病菌における RXM の標的分子として期待できた。

RXM がイネいもち病菌において *PoCdc27* の機能を阻害しているならば、*PoCDC27* 遺伝子破壊株では RXM 未添加でも付着器分化が抑制され、過剰発現株では RXM の作用が緩和されると仮定し *PoCDC27* の各変異株を作成し、解析を行った。2 回相同組換えによる遺伝子破壊を行ったが、候補株を 400 株解析しても完全な破壊株を得ることはできなかった。多くの生物で CDC27 を含む APC の構成サブユニットは生育に必須であるという知見もあり、*PoCdc27* はイネいもち病菌の生育に必須である可能性があった。しかし、遺伝子の上流領域が組換えにより変化し、付着器分化時に *PoCDC27* の発現量が野生株に比べ低下したノックダウン株が得られた。このノックダウン株では RXM を添加しても付着器

形成能は低下せず、RXM に対する感受性が低下していた。さらに過剰発現プロモーターの下流に *PoCDC27* をつないだベクターを作成し、野生株に導入することで過剰発現株を作成した。この過剰発現株では野生株と比較して、付着器形成能や菌糸成長、RXM の感受性いずれにおいても明確な差は観察されなかった。これらの結果から RXM の作用に *PoCdc27* が関与しているが、予想とは異なり *PoCdc27* の機能を阻害しているのではないということが示唆された。さらなる解析のため、*PoCDC27* の発現量が低下した変異株に過剰発現ベクターを導入し、*PoCDC27* 相補株を作成した。相補株に RXM を作用させたところ、野生株と同程度の感受性を示した。以上の結果から、RXM の付着器分化阻害作用には *PoCdc27* の存在が必要であることが示唆された。この場合、RXM の作用モデルとしては *PoCdc27* と複合体を形成することで他の因子に作用し、付着器分化を抑制したのではないということが考えられた。

本研究ではイネいもち病菌における RXM の標的探索を行いヒトにまで広く保存されている *CDC27* と相同性の高い *PoCdc27* を RXM の標的として見出したが、ヒト *CDC27* が RXM の標的分子であるか解析を行うことはできなかった。ヒトにおいても *CDC27* が RXM の標的分子であれば、RXM の作用機序解明や新薬への応用に貢献できる可能性がある。本研究で用いた手法は、イネいもち病菌の分化に影響を与える生理活性物質に広く応用可能であり、これまで解析困難であった副作用のような弱い作用の解析が可能である。さらに今回解析した RXM のように薬剤がタンパク質の機能を阻害するものでない場合も作用点特定につながり得る。そのため、様々な化合物に対し、網羅的に解析を進めることでイネいもち病菌や真菌全体に対する新たな薬効や真核生物における未解明の作用点を解明できるかもしれない。

略語表

AP	alkaline phosphates
APS	Ammonium Persulfate
DIG	digoxigenin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	ethanol
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
hph	hygromycin B phosphotransferase
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
MCS	multiple cloning site
MeOH	methanol
OM	oatmeal
PEG	polyethylene glycol
RT-PCR	reverse transcription PCR
RU	Resonance Unit
RXM	Roxithromycin
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N, N, N, N, tetrametyl ethylene diamin
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
YG	Yeast extract-Glucose
WT	wild type

目次

第 1 章 序論.....	3
第 2 章 イネいもち病菌の分化に影響を与える薬剤及びその作用点の探索	6
1. 諸言	6
2. 材料および実験方法.....	8
2.1 供試菌株と培養条件	8
2.2 一般的な分子生物学的手法	8
2.3 イネいもち病菌ゲノム DNA の調製.....	9
2.4 イネいもち病菌の付着器形成能の検定.....	9
2.5 ファージディスプレイ法.....	11
2.6 遺伝子およびタンパク質の配列解析.....	12
2.7 cDNA の調製.....	13
3. 結果.....	15
3.1 イネいもち病菌の付着器分化に対する種々の薬剤の作用.....	15
3.2 T7 ファージディスプレイ法による RXM 結合ペプチドの探索.....	17
3.3 <i>PoCDC27</i> の発現特異性解析.....	20
4. 考察.....	21
第 3 章 RXM 標的分子の解析.....	25
5. 諸言	25
6. 材料及び方法.....	27
6.1 基本的な研究手法.....	27
6.2 イネいもち病菌の形質転換	28
6.3 サザンハイブリダイゼーション	30
6.4 real time RT-PCR	30
6.5 タンパク質の調製.....	30
6.6 表面プラズモン共鳴解析	32
7. 結果.....	33
7.1 <i>PoCDC27</i> 遺伝子破壊株の作成	33
7.2 リアルタイム RT-PCR による <i>PoCDC27</i> の発現解析.....	35
7.3 <i>pocdc27</i> ノックダウン株の付着器アッセイ	36
7.4 <i>PoCDC27</i> 過剰発現株の作成.....	37
7.5 <i>PoCDC27</i> 過剰発現株の付着器アッセイと RXM の効果.....	38
7.6 <i>PoCDC27</i> 相補株の作成	40
7.7 <i>PoCDC27</i> 相補株の付着器アッセイと RXM の効果.....	41

7.8 PoCdc27 のタンパク質と RXM の相互作用解析.....	42
8. 考察.....	44
総括.....	48
引用文献.....	50
謝辞.....	61

第1章 序論

薬剤の開発は、ケミカルライブラリーの登場によるリード化合物の探索の簡易化やゲノム解析等による効率的なドラッグデザイン等、天然物のスクリーニングと比較してより網羅的に行える手法が開発され、以前より飛躍的に進むと考えられていた。しかし、有用なシーズの発見は依然として困難であり、動物実験レベルで薬剤動態や安全性が確認できてもヒトで再現できない、予想外の副作用が生じるなど新薬開発は難航し、新薬開発のコストは未だ数百億円規模となっている (Morgan *et al.*, 2011)。そこで、近年既存薬剤を利用した新規薬剤の開発や新たな薬効の利用が注目を集めている。この考えはドラッグリポジショニングとも呼ばれており、市場に出回っている薬だけでなく、すでに市場から撤退した薬や臨床研究の段階で有用でないと判断された薬剤についても研究が行われている (Ashburn and Thor, 2004)。既存の薬剤を利用する利点として、特に市販された薬についてはヒトにおける薬剤動態や安全性は確認されており、副作用などについても臨床データが十分に存在する等、低コストで薬剤開発を行うことができることが挙げられる。また、開発を中止した薬物についても新たに薬として応用できる可能性もあり、新たなシーズを探すよりも費用も時間も節約できるというメリットがある。重篤な副作用のために市場から消えた薬が再利用されている例もある。例えば Thalidomide は催奇形性があることから一時使用が中止されていたが、現在では多発性骨髄腫等に対し治療効果が見出されたことで抗多発性骨髄腫薬として再び治療に用いられている (Singhal *et al.*, 1999)。現在も使用されている薬の応用例として、Cyclosporin は免疫抑制剤として使用されているが、C 型肝炎抑制作用が見出された。この作用点が免疫抑制作用の標的分子である分子シャペロン (シクロフィリン) の抑制であることが解明され、Cyclosporin に似た構造でシクロフィリン抑制作用を持ち、より抗 C 型肝炎抑制効果の高い薬剤が研究・開発されている (Flisiak *et al.*, 2008)。また、作用点不明ながら使用されている薬の例として Acetaminophen がある。Acetaminophen は解熱鎮痛作用が知られており、治療薬として 20 年以上使用されているが作用機序は完全には解明されていない (Hodgman and Garrard, 2012)。このように既存の薬剤には作用機序不明のまま使用されている薬や新たな効用が発見される薬も多く存在しており、新薬開発への応用が期待されている。医薬品のみならず農薬等についても人に対して有害な作用が見つかり利用できないため、既存の薬剤の利用は新たな農薬開発にも有用であると考えられる。そのため、効率よい薬剤開発のためにも薬剤作用点の解明は非常に重要な課題となっている。特に農薬では医薬品に比べ作用機序についての知見が少ないためドラッグデザインが利用しにくいといった問題があり、既存の薬剤の作用点解明や新たな作用機序の発見は重要である。しかし、特に既存の薬剤は長年研究されているにも関わらず作用機序

解明に至っていないものも多い。そのようなものに対しては既存の作用点解析法では標的の解析が困難であることがその原因の一つと考えられた。こういった理由から、新規化合物はもちろん、既存の薬剤の標的を解明し得る解析手法や新規薬効の解析法の重要性がより高まっている。

既知の薬剤作用点探索法として最も広く用いられているものはアフィニティークロマトグラフィーによる pull-down 法等の生化学的手法であるが、これらは大量のタンパク質を必要とすると共に、ほとんどの場合クルードサンプル中から最も強い結合を示すものしか解析できないという欠点があった。また、近年注目されている方法としてプロテミクス解析がある (Steiner and Witzmann, 2000)。この方法では薬剤を添加した細胞内の全タンパク質の動態変化を解析するため、薬剤の作用によらない変化や標的分子の下流で影響を受ける全タンパク質の変動も含まれてしまい、解析が複雑になってしまう。そのため、薬剤の作用機序解明には有用であるが直接結合する標的分子の解析には向かないという問題点がある。また、近年研究されている本研究と同じく真菌を用いた薬剤作用点解析法として酵母の形態変化を指標とした薬剤作用点解析系がある (Ohnuki *et al.*, 2010)。これは酵母の遺伝子破壊株ライブラリーと薬剤による酵母の形質変化を比較し、共通の形質を示すものから作用点を特定しようというものである。しかし、薬剤作用による形質変化と標的遺伝子の破壊株の形質が一致しない場合があり、こういったものは解析が困難という問題点がある。このように様々な解析法が考案されているがそれぞれに解析困難な薬剤は存在する。そこで別のアプローチにより薬剤の標的解析を行うことでこれまで解析困難であった薬剤の作用点を解明できるかもしれないと考えた。

本研究では薬剤によるイネいもち病菌の付着器分化阻害を種々の阻害効果の指標として利用し、薬剤の標的探索に T7 フェージディスプレイ法を用い、既存薬剤の真菌に対する新たな薬効の発見及び真核生物における作用の解明を目的とした。T7 フェージディスプレイ法は非常に感度の高い分子間相互作用解析法であるためこれまで検出困難だった弱い相互作用も検出でき、さらに薬剤と直接相互作用する分子を幅広く探索することができる (Smith and Petrenko, 1997)。そのため、薬剤の副作用点やこれまで pull-down 法などでは検出できなかった標的分子の解析ができると考えた。また、真菌を用いることで標的遺伝子の破壊株や過剰発現株をヒトや動物に比べ、簡単に作成・解析することができ、変異株に対する薬剤作用の変化を解析することで得られた標的候補が作用点であるか、どのような作用しているかを評価できると考えた。また、真菌に対する新たな薬効の発見にもつながる可能性があると考えた。

イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae* Couch) は重要穀物であるイネに感染しイネいもち病を引き起こす植物病原糸状菌である。イネいもち病菌は重要穀物であるイネに対し甚大な被害をもたらすことから農薬や抵抗性イネ品種による防除が行なわれているが (Araki *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2011)、より環境に負荷の小さい薬剤やコメの品質を保ったまま抵抗性を持たせるなど、イネいもち病の新しい防除手段の研究、特に新しい作用機作を持った薬剤の

発見は常に重要である。そのためイネいもち病菌に対して特異性の高い新たな薬効の発見も有用である。また、真核生物のモデル生物である酵母も真菌であり、多くの場合、酵母で発見されたシグナル伝達系等はヒトでも共通であるなど、真菌とヒトで基本的な細胞内システムの共通性は高いと考えられており、イネいもち病菌とヒトでも薬剤に対して同じ作用点を持つ可能性も視野に入れ解析を行った。

第2章 イネいもち病菌の分化に影響を与える薬剤及びその作用点の探索

1. 諸言

イネいもち病菌は、主要穀物であるイネに感染するという経済的な重要性や、主要な分子生物学的研究手法を用いることができるなどその扱いやすさから植物病原菌のモデル生物として研究が行われている。イネいもち病菌の感染過程は、分生子が宿主表面に接着することから始まる (Fig. 1)。風などにより飛散した分生子は水の存在下で、孢子先端部から *spore tip mucilage* (STM) と呼ばれる粘着物質を分泌し、宿主表面に接着する。その後、分生子先端から発芽管 (*germ tube*) と呼ばれる菌糸を伸長させ、その先端に付着器 (*appressorium*) と呼ばれるドーム状の感染特異的器官を分化させる。イネいもち病菌は、付着器内部に高濃度のグリセロールを蓄積させ、それにより発生する約 8 MPa もの膨圧を利用して物理的に植物表層を貫通することで、付着器下部から侵入糸 (*penetration peg*) を植物体内に侵入させる (Howard *et al.*, 1991, Wilson and Talbot, 2009)。

イネいもち病菌の付着器は感染に重要な役割を担っており、付着器形成能が低下した株では病原性が低下する例も多く報告されているが付着器分化の詳細なメカニズムは不明な部分が多い (DeZwaan *et al.*, 1999, Ahn *et al.*, 2004, Chen J *et al.*, 2008)。また、イネいもち病菌の付着器形成過程は細胞分化のモデルとして有用な特徴をもつ。1 点目は、人工固体基質上で付着器分化能を検定することが可能ということである (Dean, 1997)。付着器形成は植物表面のワックス成分といった化学的シグナルでも誘導されるが、孢子が接着した基質の硬度や疎水性といった物理的シグナルによっても誘導でき、プラスチック等の上で付着器分化誘導が可能である。2 点目は、付着器が比較的単純な分化細胞ということである。発芽管には隔壁がなく、発芽管は 1 細胞のまま伸長し、付着器を分化する直前に核分裂が行なわれ、その後隔壁が合成されると発芽管先端部の細胞が付着器として成熟する (Saunders *et al.*, 2010a)。そのため 1 細胞系での分化とみなすことができる。3 点目として、薬剤で処理することなく短時間でほぼ同調した細胞分化を観察できることがあげられる。イネいもち病菌の分生子は水中に懸濁し、プラスチックなどの基質上で 6 時間程度静置することで通常 70% 程度の孢子が付着器を分化させる (Xiao *et al.*, 1994)。こういった特徴から付着器分化は細胞分化モデル実験系として有用である。また、前述のように付着器分化には細胞分裂を伴い、細胞分化や細胞分裂には多くの因子が関与していることからシグナルの異常や代謝異常といった様々な細胞機能阻害により付着器分化は抑制される。そのため、様々な薬剤の作用により付着器分化が抑制され得る、つまり多様な薬剤標的分子が付着器分化にも関与している可能性が高いと考えた。また、前述のように付着器は感染に重要な器官であることから分化を阻害する薬剤を解析することで抗菌剤の開発や感染機構の

解明に貢献できる可能性が考えられた。そこで、薬剤によるいもち病菌の付着器分化阻害を薬剤の生理活性作用の指標として利用することとした。

薬剤作用点探索に使用したファージディスプレイ法とは特定の分子に結合するペプチドやタンパク質を同定する手法である(Smith and Petrenko, 1997)。この方法では、ペプチドまたはタンパク質をコードする DNA をバクテリオファージゲノム内に挿入し、ファージの capsid タンパク質との融合タンパク質として発現させ、ファージ粒子の表面に呈示させる。プレートなどに固定した薬剤など標的となる分子に様々なペプチドを提示したファージを作用させることで、標的に結合するペプチド配列を呈示するファージをライブラリーの中から選び出すことができる。このファージディスプレイ法はこれまで、受容体、酵素の基質やインヒビター、エピトープ、改良抗体、酵素、cDNA クローンなど、さまざまな分子に結合するペプチドの同定に用いられてきた。ファージディスプレイ法では、結合したファージが 1 分子でも存在していれば大腸菌に感染させ増幅できるため、従来の pull-down 法といった生化学的手法に比べ非常に感度が優れている。ファージディスプレイ法を薬剤の作用点探索に用いることでこれまでほとんど解析できなかった弱い相互作用まで解析でき、これまで検出できなかった作用点や副作用点などの解析に有用なのではないかと考えた。また、本研究でファージディスプレイ法を用いるさらなる利点として、イネいもち病菌ではディスプレイライブラリーとしてゲノムライブラリーを用いることができるという点があげられる。イネいもち病菌はゲノムサイズが約 42 Mb と小さく、コード領域がゲノムの約 50% を占めており比較的 non-coding 領域の割合が少ない (Dean *et al.*, 2005)。そのためゲノムライブラリーを cDNA ライブラリーの代わりとして用いることができる。cDNA ライブラリーの場合、mRNA 量が直接反映されてしまい、ライブラリー内の遺伝子に大きな偏りができてしまうという欠点があるが、ゲノムライブラリーを用いる場合、遺伝子の発現量に関係なく、理論上は全ての遺伝子を等量含んだライブラリーを構築できるという利点がある。

本研究では、まずイネいもち病菌の付着器分化に影響を与える薬剤を探索し、ファージディスプレイ法を用いて作用点探索を行うことで、既存の薬剤の新規薬効や真核生物における作用点解析を目的とした。

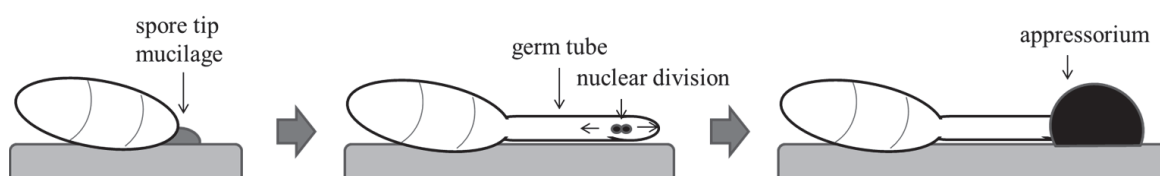


Fig. 1 Infection mechanism of *P. oryzae*.

Infection of *P. oryzae* occurs when fungal conidia attach to leaf surface with spore tip mucilage. A single round of nuclear division occurs shortly after spore germination on the surface of rice plant and then a unicellular specialized infection structure known as an appressorium is differentiated at the tip of germ tube.

2. 材料および実験方法

2.1 供試菌株と培養条件

本研究で用いたイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) は、当研究室で継代している日本産イネいもち病菌 P2 株及び外国産株である Guy11 株を使用した (Leung *et al.* 1988)。

供試菌株はオートミール寒天培地 (OMA; 5% [w/v] oatmeal ((The Quaker Oats Company, Chicago, USA) をコーヒーミル (MK-61M-G, National, 大阪府) で粉末にしたもの), 0.5% [w/v] sucrose (ナカライテスク, 京都府、以後特に言及がない限り試薬はナカライテスク社製のものを使用した), 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業, 大阪府)) のスラントで保存した。本菌の培養にはYG寒天培地 (0.5% [w/v] Yeast Extract, 2.0% [w/v] glucose, 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業)) もしくはOMA培地 (oatmeal agar) を平板培地で用い、28 °Cで静置培養した。液体培地で培養する場合はYG液体培地を使用し、28 °C、150 rpmで振盪培養した。

本菌の分生胞子は7日間 OMA 培地上で培養した菌叢から滅菌筆で気中菌糸を除去後、培養シャーレは密封せずに BLB ランプ (FL20S・BLB, Toshiba, Tokyo) 照射下で3日間培養することにより胞子形成を誘導した。形成された胞子は滅菌筆で滅菌蒸留水中に懸濁後、血球計算盤により胞子数を観察し、各実験に適した濃度に調製し、胞子懸濁液として使用した。

また、形質転換を行ったイネいもち病菌は各実験に用いる前に、胞子を抗生物質入りの選択培地に播き、単コロニーを新たにピックアップすることで単胞子分離を行った。

2.2 一般的な分子生物学的手法

2.2.1 大腸菌の形質転換及びプラスミド DNA の調製

コンピテントセルとして大腸菌 DH5 α 株 (F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rK⁻, mK⁺), *phoA*, *supE44*, λ^{-} , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) を用い形質転換を行った。

大腸菌の形質転換及びプラスミドDNA抽出は、常法に従って行った (Sambrook and Russell, 2001)。大腸菌をLB液体培地 (1.0% [w/v] tryptone, 0.5% [w/v] yeast extract, 1.0% [w/v] NaCl) で1日培養した後、プラスミド抽出を行った。

2.2.3 クローニング

制限酵素は New England BioLabs 社製のものを使用し、推奨されている至適緩衝液で反応させた。制限酵素処理を行ったベクターは Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP, New

England BioLabs) により脱リン酸化反応を行ってからライゲーションに用いた。それぞれ酵素付属の解説書に従って至適条件下で 2-4 時間反応させた。ライゲーション反応は、Ligation convenience kit (ニッポン・ジーン, 東京都) を使用し、キットのプロトコールに従った。反応後のライゲーション産物を用い、〈2.3.1 大腸菌の形質転換〉に従って大腸菌を形質転換した。

2.3 イネいもち病菌ゲノム DNA の調製

100 ml の YG 液体培地で 2-3 日間振盪培養 (170 rpm, 28 °C) した菌体を遠心分離 (2000×g, 10 min) によって回収した。回収した菌体をの水分を除いた後、乳鉢に移し液体窒素を加えて粉末状に凍結粉砕した。破碎菌体 0.1 g 当たり、500 µl の DNA Extraction buffer (0.1 M EDTA (関東化学), 10 mM Tris-HCl, 0.5% [w/v] SDS, pH 8.0) に懸濁した。1.5 ml 容微量遠心管に移し、等量のフェノール/クロロホルムを加え、遠心分離 (4 °C, 15000 rpm, 5 min) 後、上清を回収し、タンパク質を除去した。回収した上清に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム、等量のイソプロパノールを加え、DNA を沈殿させた。沈殿を 70% [v/v] エタノールでリンス後、RNaseA 含有の滅菌蒸留水 (20 µg/ml RNaseA (Roche)) に溶解した。

また、少量のゲノム DNA を得たい場合には以下の簡易抽出法の手順で行った。2 ml 容微量遠心管または 24 ウェルプレートの各ウェルに 1 ml ずつ YG 液体培地を分注し、平板培養したイネいもち病菌の菌糸片を植菌後、28 °C で 3-4 日間静置培養した。1.5 ml 容微量遠心管に菌糸体を回収し、500 µl ずつ Lysis buffer (0.4 mM Tris-HCl, 0.06 mM EDTA (関東化学), 0.15 ml NaCl, 1% [w/v] SDS, pH8.0) を加え、竹串などで菌糸体を潰し、破碎した。その後、65 °C で 10 min、Vortex (Automatic Mixer S-100 (TAITEC, 埼玉)) による攪拌 10 min を 3 回繰り返す、150 µl の Solution (3 M CH₃COOK, 11.5% [v/v] glacial acetic acid) を添加した。その後、フェノール/クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿、70% [v/v] エタノールでリンスを行った後、RNaseA 含有滅菌蒸留水 (20 µg/ml RNaseA (Roche)) に溶解した。

2.4 イネいもち病菌の付着器形成能の検定

2.4.1 ポリカーボネート板上における付着器形成能の検定

ポリカーボネート板はスライドガラスと同様のサイズに切断し、使用前に蒸留水で 15 min 洗浄を 2 回行った。〈2.1 供試菌株と培養条件〉の手順で孢子懸濁液を取得し、 3×10^4 個/ml になるよう調付した孢子懸濁液をポリカーボネート板の上に 20 µl ずつ滴下した。乾燥を防ぐため蒸留水で湿らせたペーパータオルを敷いたプラスチックケース内に配置し、

室温下に 6 h 静置後、カバーガラスを乗せ顕微鏡観察を行った。

1 サンプルにつき胞子を 100 個以上観察し、発芽率（発芽した胞子数/全胞子数）、付着器形成率（付着器を形成した胞子数/発芽した胞子数）を測定し、付着器形成能および発芽管形成能を検定した。

2.4.2 プラスチックカバーガラス上における付着器形成能の検定

スライドガラスに 5 μ l ずつ滅菌蒸留水を滴下し、その上に蒸留水で洗浄した Microscope Cover Slips (Fisher scientific, USA, Massachusetts) を乗せ、そこに 3×10^4 個/ml になるよう調付した胞子懸濁液を 20 μ l ずつ滴下した。以下〈2.4.1 ポリカーボネート板上における付着器形成能の検定〉と同じ操作で行った。

2.4.3 薬剤を添加した付着器形成能の検定

それぞれの薬剤は表 1 に示すように溶媒に溶かし、EtOH に溶かしたものは EtOH が終濃度 1% となるよう、DMSO に溶かしたものは DMSO が終濃度 1% となるよう、MeOH に溶かしたものは MeOH の終濃度が 10% となるよう、acetone に溶かしたものは acetone が終濃度 1% となるよう適宜薬剤の濃度を調製し、 3×10^4 個/ml の胞子懸濁液に混合した。以下〈2.4.1 ポリカーボネート板上における付着器形成能の検定〉と同じ操作を行い、ポリカーボネート板またはプラスチックカバーガラス上で付着器形成を誘導した。EtOH のみを終濃度 1% となるように添加したもの、DMSO のみを終濃度 1% となるように添加したもの、MeOH のみを終濃度 10% となるように添加したもの、acetone のみを終濃度 1% となるように添加したもの、何も添加していないものを control として薬剤添加サンプルと同時に観察を行った。

Table 1 Chemicals used in this chapter.

name	stock concentration (mg/ml)	solvent
Erythromycin	10	EtOH
Roxithromycin	10	EtOH
Josamycin	100	EtOH
Midecamycin	100	EtOH
Avermectin B1	20	DMSO
Milbemycin K	20	EtOH
Actinomycin D	20	DMSO
Hadacidin	100	H2O
Herbimycin A	200	DMSO
Rifampicin	20	DMSO
Chloramphenicol	100	EtOH
Tetracycline	90	MeHO
Streptomycin	100	H2O
Aspirin	10	EtOH
Salicylic acid	10	EtOH
5-OH-9-Me-Streptimidone	20	EtOH
Cyprodinil	10	acetone
Mepanipyrim	10	acetone
Pyrimethanil	10	acetone
Herbicidein A	100	H2O
Polyoxin A	100	H2O
Tubercidin	20	DMSO
Tunicamycin IV	20	DMSO
Venturicidin A	20	EtOH

2.5 フェージディスプレイ法

2.5.1 Biotinylated Roxithromycin (Bio-RXM) の合成

Bio-RXM は森村らの方法 (Morimura *et al.*, 2006) をもとに合成を行った。出発材料として RXM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用い、RXM 誘導体に biotin PEO-LC amine (Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL USA) を付加し、Bio-RXM を合成した。合成産物は ^1H NMR と TOF-MS 解析により確認した。Bio-RXM の理論値 $\text{C}_{63}\text{H}_{113}\text{N}_6\text{O}_{22}\text{S}$ (M+H) $^+$ 1337.7623 に対し、TOF-MS 解析の結果は 1337.7580 であった。

2.5.2 フェージ DNA ライブラリー及び大腸菌 BLT5615 host の作製の作成

フェージ DNA ライブラリー及び大腸菌 BLT5615 host は T7Select Phage Display System (Novagen, Madison, WI) のマニュアルに従い、作成した。

フェージ DNA ライブラリー用ベクターには T7Select 10-3b (Novagen) を使用し、インサートには制限酵素により断片化したイネいもち病菌のゲノムを使用した。Sau3AI 処理したゲノム DNA を BamHI 処理した T7Select 10-3b に〈2.2.3 クローニング〉に従い導入した。PCR により得られたライブラリーはインサートの挿入率が 80%程度であり、100-1500 bp

の DNA 断片が挿入されていることを確認した。確認には T7 UP (GTAAAGCTGCGTGACTTGGC) と T7SelectDOWN (AACCCCTCAAGACCCGTTTA) のプライマーセットを用いた。

大腸菌 host には BLT5615 (F^- , *ompT*, *hsdS_B* ($r_B^- m_B^-$), *gal*, *lac*, *dcm*, pAR5615 (Amp^R)) を使用した。終濃度 50 µg/ml になるよう Carbenicillin を添加した M9TB (18 mM NH₄Cl (関東化学), 39 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄ (関東化学), 70 mM Na₂HPO₄·7H₂O (和光純薬工業), 1mM MgSO₄ (和光純薬工業), 0.4% [w/v] glucose, 1.2% [w/v] peptone, 2.4% [w/v] yeast extract, 0.4% [v/v] glycerol) で前培養を行い、終濃度 50 µg/ml になるよう Carbenicillin 添加した TB 培地 (17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄ (関東化学), peptone, 2.4% [w/v] yeast extract, 0.4% [v/v] glycerol) で本培養を行った。IPTG を最終濃度 1 mM になるように加え、大腸菌 BLT5615 host とした。大腸菌の形質転換及びプラスミド DNA 抽出は、常法に従って行った (Sambrook and Russell, 2001)。

2.5.3 バイオパニング

React-Bind Streptavidin coated HBC plates (Pierce, Rockford, IL) に TBS (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.8% [w/v] NaCl) で希釈した Bio-RXM (5 pmol/µl, 1% [v/v] DMSO) を 100 µl 加え、固定した。Bio-RXM を固定しないコントロールの系には、TBS (1% [v/v] DMSO) を 100 µl を加えた。その後、TBS で 3 回洗浄した。

各ウェルに 10¹⁰ pfu/ml になるように調製したファージライブラリーを 100 µl 加え、TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.8% [w/v] NaCl, and 0.1% [v/v] Tween 20 (Sigma-Aldrich)) により 5 回洗浄した。各ウェルに大腸菌 BLT5615 host (100 µl) を加え、ファージを回収・増幅し、このファージライブラリーを再び 10¹⁰ pfu/ml になるように調製し、各ウェルに 100 µl 加えた。以上の作業を 4 回繰り返し、濃縮されたファージのゲノムを抽出・PCR (T7up/T7SelectDOWN プライマーペア) を行い、ファージの呈示したペプチドの予想配列を、DNA シーケンサーを用いて解析した。

2.6 遺伝子およびタンパク質の配列解析

イネいもち病菌の塩基配列情報及びタンパク質情報は Broad Institute の *Magnaporthe oryzae* database (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/magnaporthe_grisea/MultiHome.html) から得た。相同性検索には National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST 検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) も使用した。

ヒトの塩基配列情報及びタンパク質情報は NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した。

2.7 cDNA の調製

2.7.1 栄養菌糸からの RNA 抽出

菌糸体からの RNA の調製は ISOGEN (ニッポン・ジーン) を用い、キット付属のプロトコルを改変して行った。〈2.3 イネいもち病菌の DNA 調製〉と同様の手順で培養、液体窒素による破碎を行った。粉末状に菌体 0.1 g に対し 1 ml の ISOGEN を加え、さらにクロロホルム 0.2 ml を加え、遠心分離 (4 °C, 15,000 rpm, 15 min) を行った。上清を新たな 1.5 ml 容微量遠心管に移し、等量のクロロホルムを加え、転置攪拌後、遠心分離 (4 °C, 15,000 rpm, 15 min) を行った。上清に、0.8 倍量のイソプロパノールを加え室温で 10 min 静置し、遠心分離 (4 °C, 15,000 rpm, 10 min) を行った。上清を捨て、1 ml の 70% [v/v] EtOH でリンスした後、室温で 10 min 風乾させた。風乾後、RNase free な滅菌蒸留水で溶解させた。抽出した RNA を RQ1 DNase (Promega, WI, USA) で処理することでゲノムを消化した。その後、再度 ISOGEN を用いて抽出することで、タンパク質を除去した。

2.7.2 付着器形成時 (AF; Appressorium Formation) および発芽管伸長時 (NA; Non Appressorium Formation) の RNA 抽出

〈2.1 供試菌株と培養条件〉の手順で孢子懸濁液を取得し、滅菌蒸留水で密度を 1×10^5 個/ml に調付し使用した (発芽管伸長時は 2% [w/v] yeast extract で孢子を懸濁し、付着器の形成を抑制)。人工固体基質としてポリカーボネート板を使用した。ポリカーボネート板は滅菌蒸留水で 15 分以上振盪することで洗浄した。これを蒸留水で湿らせたペーパータオルを敷いたプラスチックケース内に配置し、 1×10^5 個/ml に調付した孢子懸濁液をポリカーボネート板上に滴下した後、室温、保湿状態で 3 h 静置した。付着器 (または発芽管) を形成していることを確認後、ポリカーボネート板上の水滴を捨て、液体窒素で急速凍結させた後、凍結乾燥機 (FDU-2100, EYELA) で凍結乾燥した。その後、ポリカーボネート板上に張り付いた試料をカミソリ (フェザー安全剃刀株式会社, 大阪府) で削ぎ落とし、液体窒素を用いて破碎した。粉末状にした菌体に ISOGEN を 800 μ l 加え、以下 〈2.7.1 栄養菌糸からの RNA 抽出〉と同じ手順で RNA を抽出した。

2.7.3 cDNA 合成及び RT-PCR

RT-PCR に用いる first strand cDNA の合成は、抽出した total RNA を鋳型とし、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, Amersham, UK) を用いて、キット付属のプロトコールに従って行った。このときプライマーは、Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を用いた。その後、合成した cDNA を鋳型として PCR を行った。*PoCDC27* の増幅には *PoCDC27* RT F (ATAAGAATACGGCGGTCCATC) と *PoCDC27* RT R (GGTAGCCCAAGAAAAGCAAC) のプライマーペアを用い、*GAPDH* の増幅には *GAPDH* F (GACCGGAGGCGAGACTCA) と *GAPDH* R (GCGTCGACGTTCCAGATGTA) のプライマーペアを用いた。

3. 結果

3.1 イネいもち病菌の付着器分化に対する種々の薬剤の作用

様々な化合物についてイネいもち病菌の付着器分化への影響を調べるため、イネいもち病菌の分生子に薬剤を添加し、付着器形成誘導を行った。抗生物質や抗菌剤、抗炎症剤など 24 種類の薬剤について観察を行い、阻害効果が見られた最少濃度とその阻害作用について結果を Table 2 にまとめた Streptomycin では今回測定したどの濃度でも分化阻害、生育阻害共に見られなかった。また、ピリミジン系抗真菌薬 (Cyprodinil, Mepanipyrim, Pyrimethanil) といった真菌に活性を示す抗生物質 (Heye *et al.*, 1994, Miura *et al.*, 1994, Neumann *et al.*, 1992) や Tetracycline など 13 種類の薬剤についてイネいもち病菌に対し、付着器分化阻害と同時に発芽や発芽管の伸長を阻害するという強い生育阻害効果が見られた。

本研究で注目すべき付着器分化特異的な阻害効果が見出された薬剤は、マクロライド系抗生物質 6 種類 (Erythromycin, Roxithromycin, Josamycin, Midecamycin, Avermectin B1, Milbemycin K) と、Hadacidin, Chloramphenicol, Rifampicin, Aspirin の計 10 種類であった。

今回調べたマクロライド系抗生物質のほとんどで付着器分化特異的な阻害効果を示す濃度が存在していた。その中で、作用点不明ながら炎症の治療にも用いられており、比較的付着器分化阻害効果の強かった Roxithromycin (RXM) に注目した。RXM の既知の作用点は 50S リボソームサブユニットであり、原核生物のタンパク質合成を阻害する。さらに真核生物に対し、抗炎症作用、血管新生抑制作用、サイトカイン調整作用等様々な有用な作用が報告されている (Ueno *et al.*, 2005, Schlünzen *et al.*, 2001, Suzaki *et al.*, 1999, Yatsunami *et al.*, 1999, Kawasaki *et al.*, 1998)。しかし、真核生物に対する作用点はいまだほとんど解明されていない。真核生物に対し、未解明の作用点の存在が示唆されているものの、真菌に対する作用はほとんど報告されていないことから、イネいもち病菌における RXM の作用は RXM の新たな作用であると考えられた。

RXM についてイネいもち病菌の付着器分化を阻害した濃度の前後でさらに細かく濃度を振って観察したところ、50 $\mu\text{g/ml}$ までは阻害効果は見られず、100-200 $\mu\text{g/ml}$ でほぼ一定の付着器分化抑制効果が見られ、250 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度では強い生育抑制効果が見られた (Fig. 2; 何も添加していないサンプルを 1 とした相対値で示した)。この結果より以降 P2 株由来の株に対し、付着器分化阻害作用を調べる際には 100 $\mu\text{g/ml}$ の RXM を使用し、生育阻害について調べる際には 250 $\mu\text{g/ml}$ の RXM を作用させた。また、イネいもち病菌研究において世界的に用いられているガイアナ産のイネいもち病菌野生株 Guy11 についても実験を行ったところ、同様の作用が見られたが Guy11 株では 250 $\mu\text{g/ml}$ の RXM 添加で付着器分化阻害が、300 $\mu\text{g/ml}$ 以上の RXM 添加で生育阻害がそれぞれ見られた。

Table 2 Effect of chemicals on *P. oryzae*.

Chemicals	concentration ($\mu\text{g/ml}$)	inhibition
Erythromycin	200	appressorium formation
Roxithromycin	100	appressorium formation
Josamycin	1000	appressorium formation
Midecamycin	1000	appressorium formation
Avermectin B1	10	appressorium formation
Milbemycin K	10	appressorium formation
Actinomycin D	100	fungal growth
Hadacidin	1000	appressorium formation
Herbimycin A	10	fungal growth
Rifampicin	100	appressorium formation
Chloramphenicol	100	appressorium formation
Tetracycline	300	fungal growth
Streptomycin	1000	no inhibition
Aspirin	100	appressorium formation
Salicylic acid	100	fungal growth
5-OH-9-Me-Streptimidone	10	fungal growth
Cyprodinil	100	fungal growth
Mepanipyrim	100	fungal growth
Pyrimethanil	100	fungal growth
Herbicide A	1000	fungal growth
Polyoxin A	100	fungal growth
Tubercidin	0.1	fungal growth
Tunicamycin IV	10	fungal growth
Venturicidin A	0.1	fungal growth

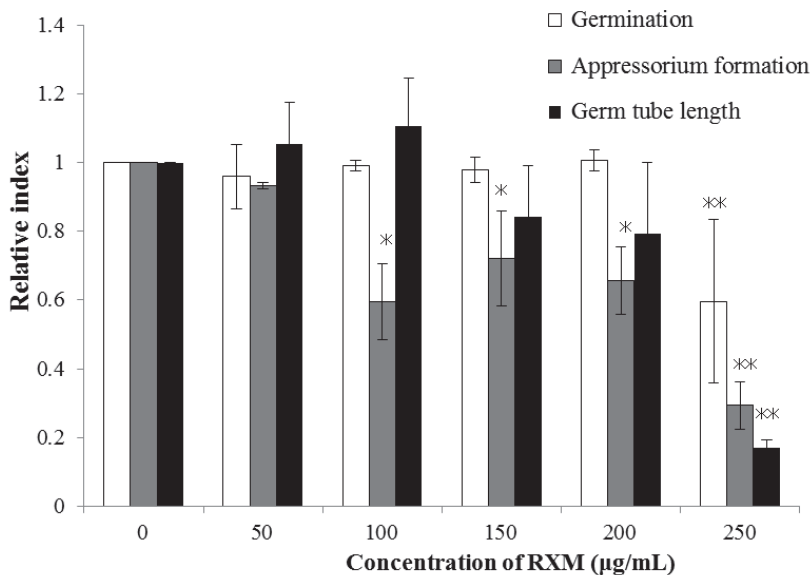


Fig. 2 Effects of RXM on the Development of the Rice Blast Fungus P2 Wild-Type Strain.

Conidia of P2 strain were suspended in distilled water containing various concentrations of RXM. The frequency of conidial germination and appressorium development and the length of non-appressorium forming germ tubes were assessed at 6 h after inoculation on microscope cover slips. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to 0 $\mu\text{g/mL}$ of RXM.

3.2 T7 ファージディスプレイ法による RXM 結合ペプチドの探索

T7 ファージディスプレイ法により RXM 結合ペプチドの探索を行った。RXM を biotin-avidin の相互作用を利用してプレートに固定するため、bio-RXM を作成した (2.5.1 Biotinylated Roxithromycin (Bio-RXM) の合成)。この bio-RXM についてもイネいもち病菌において 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上で付着器分化抑制作用があることを確認した (Data not shown)。今回、ファージディスプレイに用いる DNA ライブラリーとしてイネいもち病菌のゲノムライブラリーを使用した。イネいもち病菌はゲノムサイズが小さく、コーディング領域がゲノムのおよそ 50% を占めている。そのため、ゲノムライブラリーを cDNA ライブラリーの代わりに用いることができ、時期や部位特異的に発現する遺伝子などを含むほぼすべての遺伝子について解析できるという利点がある。

T7 ファージディスプレイ法による探索を 30 回行った結果、いくつかの RXM 結合ペプチド断片が得られ、そのうちイネいもち病菌のタンパク質と高い相同性示したものを Table 3 に示した。T7 ファージディスプレイ法によって得られた呈示ペプチドの 1 つ pe32-11 の配列 (table 3) はイネいもち病菌において 20S cyclosome subunit CDC27 (以下 CDC27) のホモログとデータベース上で推定された MGG_06292.6 (*P. oryzae* cell division cycle 27 homolog; PoCdc27) と相同性が高い (E-value=0) ことが分かった (Fig. 3)。イネいもち病菌において PoCdc27 の機能解析は行われていなかったが、ヒトや酵母など他の生物においては CDC27 の機能解析が進んでいた。CDC27 は APC と呼ばれる有糸分裂後期チェックポイントに関わるユビキチンリガーゼを構成するサブユニットの一つで (Peters, 2006)、TPR (tetra-trico peptide repeat) ドメインを持ち、タンパク質間相互作用に関与する (Vodermaier *et al.*, 2003)。CDC27 はヒトや植物、真菌等真核生物に広く保存されていることが報告されている (Yu, 2002, Thornton *et al.*, 2006, Peters, 2006)。イネいもち病菌は付着器分化の過程で核分裂を行うため (Saunders *et al.*, 2010a)、核分裂に関与する因子は付着器に関与する可能性があり RXM の標的候補分子として PoCdc27 に注目し解析を進めることとした。

Table 3. RXM binding peptide selected from phage display library.

No	peptide sequences	protein	E-value
27-2	GDRSSKARATAPGTCSGLRLPSPRPQSFEPASQHSARASQDAHASVEPGQEHC SRGEVGAQRAPRDAGRARIQQRGDIPKPI.	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	9.38E-41
29-4	GRIE AETGARPRDPLSLPLPEEDLETGQQQKALEMVRQARQAQELARNNGLG AQIEQQRQANKRRPVDFTVGD AVYVSKKGFSTEAPTTKLD SQNAGPWITLGEKGHSFILDTPAWYKGSKLFHASRLRKAATDQGPQQSTSNIIEEPARRSSR.	hypothetical protein	0
32-11	GDLLDTPPAPSAPVEINALRGGAHPEPPHAPMRKTRAAHTIEPPSDAPPRMGYRGITKRRANLDPNSEAPSATEQPASQMLRTSASSLLGAEQRKRTISGHPVQSRPGVTEEPGAPQRRSARLNMFKQPSTAKPNAAAAPIGTTSTREMKKARPAISRIMRPGSSGSSVGRVVS GNRKPV EENTMDVDPNSPAGISRELVDKLA AALE.	20S cyclosome subunit MoCDC27 (BimA/Nuc2/Cdc27)	0
35-16	GGSP LGRDSAKTPITRGHLEHQESPD SRDKQVTAVRTLNTAGTESRNKRQLLDHAQLNETRTRPVSKVKS RPRAALGPTRLKVDPISTAFRVDSL CATGNKDDPGWKRVCKRGGPRAPHNAEXAAQPCMTACVVFSRLLADVTCATRSCXGVDPNSPAGISRELVDKLA AALE.	hypothetical protein	0

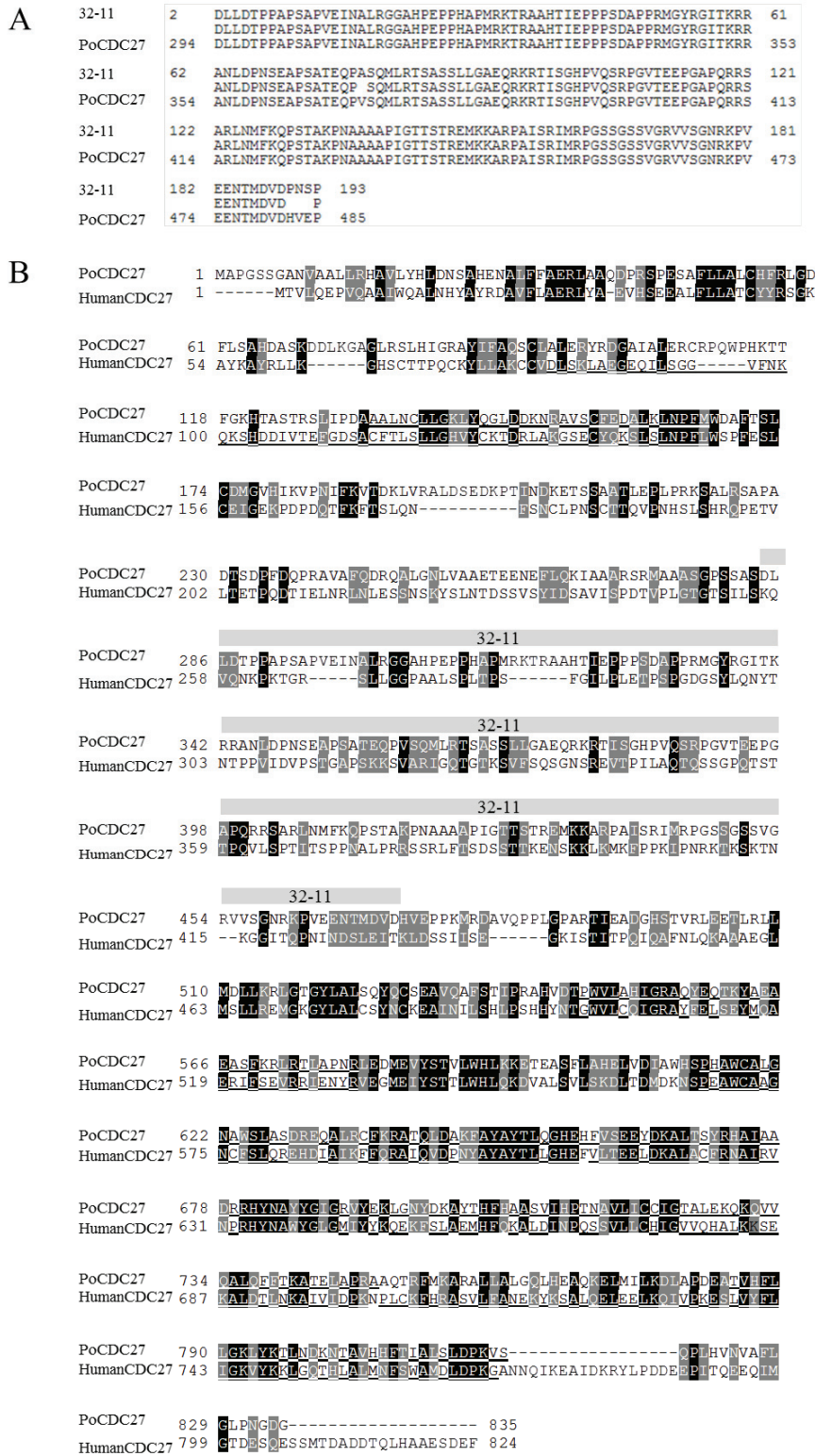


Fig. 3 Amino Acid Sequence of PoCdc27 (MGG 06292).

(A) Possible RXM target peptide 32-11 was aligned with part of PoCdc27. The homology between those amino acid sequences was 98%. (B) The deduced amino acid sequence of PoCdc27 was compared with human CDC27. The *PoCDC27* gene consists of 2,508 bp and encodes 835 amino acids. PoCdc27 displayed 30% identity to human CDC27. A similar region with 32-11 is illustrated by a gray bar, and tetratrico peptide repeat domain is underlined.

3.3 *PoCDC27* の発現特異性解析

RXM が付着器形成を特異的に阻害したことからターゲットは付着器形成時に発現している、あるいは付着器分化に関わる遺伝子である可能性が高いことが予想された。そこで、まずイネいもち病菌の各成長段階における *PoCDC27* 遺伝子の発現量を調べた。栄養菌糸成長時 (VG)、付着器形成時 (AF)、発芽管伸長時 (NA) の各成長段階のイネいもち病菌から RNA を抽出し (2.7 cDNA の調製)、*PoCDC27* の発現量を RT-PCR により比較した。

PoCDC27 は栄養菌糸時に比べ、発芽管伸長時、特に付着器形成時に強く発現していることが分かった (Fig. 4)。この結果から *PoCdc27* は RXM の標的候補として期待できた。

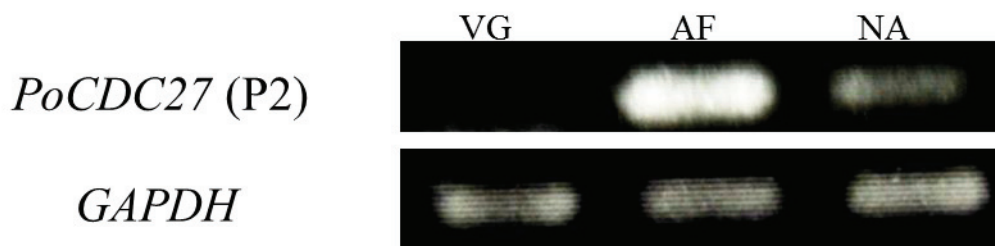


Fig. 4 Semi-Quantitative RT-PCR Analysis of *PoCDC27* Gene Expression.

The phase-specific expression of *PoCDC27* in *P. oryzae* was analyzed by RT-PCR. RNA was extracted from vegetatively growing mycelia (VG), appressorium-forming germ tubes (AF), and non appressorium forming germ tubes (NA) of P2. The expression of *GAPDH* was used as internal control.

4. 考察

薬剤によるイネいもち病菌の付着器分化阻害を様々な阻害効果の指標とすることで、抗生物質等種々の化合物のイネいもち病菌に対する新規作用の発見や真核生物における未解明の作用点の解析を目的に 24 種類の化合物をイネいもち病菌の胞子へ作用させた。この薬剤のうち測定した範囲で何の効果も示さなかったものが 1 種類、発芽や発芽管伸長阻害といった比較的強い生育阻害効果が付着器分化阻害と同時に見られたものが 13 種類、生育をほとんど阻害せずに付着器分化阻害効果を示したものが 10 種類であった (Table 2)。

まず、イネいもち病菌に対して何の効果も示さなかったのは Streptomycin であった。その理由の 1 つとしては原核生物のタンパク質合成阻害剤であることから真核生物内で作用点が存在しなかった可能性がある (Pestka, 1971)。また、Streptomycin はヒトにおいて腸での吸収が悪いということが知られているなど、細胞への透過性が低かった可能性も考えられる (Adrock and Hettig, 1946)。

強い生育阻害効果が見られたものは、テトラサイクリン系抗生物質である Tetracycline、グルタルイミド系抗菌剤である 9-Me-Streptimidone、RNA 合成阻害剤である Actinomycin D、アンサマイシン系抗生物質である Herbimycin A、ピリミジン系殺菌剤である Cyprodinil、Mepanipyrim、Pyrimethanil、抗真菌剤として知られる Polyoxin A、Venturicidin A、鎮痛剤として用いられる Salicylic acid、核酸系抗生物質の Herbicidin A、DNA 合成阻害剤の Tubercidin、糖鎖合成阻害剤である Tunicamycin IV の 13 種類であった。これらすべての薬剤で真核生物に対する毒性あるいは真菌に対する殺菌作用や生育阻害が報告されていることからイネいもち病菌に対しても毒として作用し、生育阻害を引起したと考えられる。Tetracycline では、原核生物のタンパク質合成阻害だけでなく、40S リボソームサブユニットに結合し、真核生物のタンパク質合成を阻害することが報告されている (Sarkar and Thach, 1968, Weisblum and Davies, 1968)。また、グルタルイミド系抗菌剤は真核生物の 60S リボソームサブユニットに結合し、殺菌剤として使用されている (Obrig *et al.*, 1971)。Actinomycin D は抗ガン活性を持つと共に正常細胞に対しても強い毒性を示すことが報告されている (Reich *et al.*, 1962、Philips *et al.*, 1960)。Herbimycin A はチロシンキナーゼ阻害剤であり、除草剤として用いられていた (Hidesuke *et al.*, 1991)。ピリミジン系殺菌剤は抗真菌薬として用いられ、糸状菌が原因となる病害防除に用いられる (Heye *et al.*, 1994, Miura *et al.*, 1994, Neumann *et al.*, 1992)。Polyoxin A は真菌類の細胞壁構成成分であるキチン合成を阻害する (Endo *et al.*, 1970)。また、Venturicidin A は H⁺輸送型 ATP 合成酵素に作用し、ATP 合成を阻害することが知られている (Zhang *et al.*, 1993)。Salicylic acid は消炎・鎮痛作用だけでなく抗菌作用も知られ、水虫の治療などに用いられている (Amborabé *et al.*, 2002)。Herbicidin A は抗菌活性があり、また除草剤としてももちいられる (Arai *et al.*, 1976)。Tubercidin はア

デノシンのアナログであり、抗菌活性を持つことが知られている (Hwang *et al.*, 1994)。Tunicamycin IV は、N-グリコシド糖鎖合成を阻害する抗生物質であり、抗菌活性を持つ (Takatsuki *et al.*, 1971, Chaffin *et al.*, 1985)。

本研究で注目した付着器分化を特異的に阻害できた薬剤としては、マクロライド系抗生物質 6 種類 (Erythromycin, Roxithromycin, Josamycin, Midecamycin, Avermectin B1, Milbemycin K)、Hadacidin、Chloramphenicol、Rifampicin、Aspirin の計 10 種類であった。Hadacidin は DNA 合成阻害剤としてすでに標的が解明されており、今回付着器形成を阻害したのは付着器形成に細胞分裂が関与しているためだと考えられる。実際、Hadacidin には抗ガン活性があることが報告されており、細胞分裂を阻害すると考えられている (Kaczka *et al.*, 1962)。Chloramphenicol は 50S リボソームサブユニットに結合し、原核生物のタンパク質合成を阻害する。しかし、ヒトに対して再生不良性貧血という重篤な副作用を引起すことも知られており、この原因はいまだ解明されていない (Cohen and Creger, 1967)。Rifampicin は細菌の RNA ポリメラーゼ阻害剤であるが、ヒトにおいて小腸での P 糖タンパク質を誘導する作用も知られていた。しかし、このヒトに対する作用機作はすでに一部解明されている (Geick *et al.*, 2001, Greiner *et al.*, 1999)。Aspirin は鎮痛作用や抗血小板薬としての標的が解明されているが、他にも大腸がんに対する予防効果等、新たな作用が発見されている (Smith and Willis, 1971, Stark *et al.*, 2001)。マクロライド系抗生物質の主な作用点は 50S リボソームサブユニットであり、原核生物のタンパク質合成を阻害する (Bryskier, 1998, Young *et al.*, 1989)。しかし、ヒトに対して抗炎症作用や抗ガン作用等作用点未解明の有用な作用を持つことが知られている (Jones, 1999, Scaglione and Rossoni, 1998)。Avermectin B1, Milbemycin K はアベルメクチン類と呼ばれ、16 員環マクロライド系抗生物質であるが、殺虫剤として使用される。作用機作は、グルタミン酸開口型 Cl チャネルに作用して細胞膜の過分極を引起すことが知られている (Danaher *et al.*, 2006)。Chloramphenicol、Rifampicin、Aspirin、マクロライド系抗生物質について既知の作用点ではイネいもち病菌の付着器分化阻害を引起した原因が説明できず、真核生物における未解明の作用点の存在が示唆された。そこで、マクロライド系抗生物質に注目し、解析を行うこととした。マクロライド系抗生物質ではないが、同様に 70S リボソームに作用するテトラサイクリンやストレプトマイシン (Honore N and Cole, 1994, Zhang Y, 2005, Brodersen *et al.*, 2000, Pioletti *et al.*, 2001) では生育阻害を起こさない濃度で付着器分化を阻害する作用は見られていない。このことから、マクロライド系抗生物質にはイネいもち病菌においてリボソーム以外の作用点が存在する可能性が高いと判断した。

マクロライド系抗生物質に注目した理由は以下の 3 点である。1 点目はヒトに対し有用な作用が確認されており、真核生物における作用点の存在が示唆されているにも関わらず標的分子がほとんど解明されていないことがあげられる。2 点目として、マクロライド系

抗生物質は、近年ウイルス感染抑制作用が見つかるなど新規作用も注目されており (Min and Jang, 2012)、イネいもち病菌に対する分化抑制効果は真菌に対する新たな作用としても重要であると考えた。また、3 点目として作用の強さの傾向がこれまで報告されていたヒトやマウスなど真核生物に対する作用とイネいもち病菌に対する作用が似ていたため、ヒトを含めた真核生物で共通の作用点が存在する可能性が考えられたためである。抗炎症作用等真核生物に対する作用について 14 員環、15 員環のものでは作用が強く、16 員環のものでは作用が弱いかほとんどない傾向にある (Čulić *et al.*, 2001, Kohyama *et al.*, 1999, Yatsunami *et al.*, 1999)。今回イネいもち病菌に作用させた結果も 14 員環マクロライド系抗生物質である Erythromycin, Roxithromycin で比較的強い付着器分化抑制作用が見られ、16 員環の Josamycin, Midecamycin では比較的弱い付着器分化抑制作用が見られた。これらの理由からイネいもち病菌における付着器分化阻害効果の作用点を解析することで農薬への応用や付着器分化機構の解明だけでなく、真菌であるイネいもち病菌とヒトで共通の作用点となるものが見出すことができれば興味深いと考えた。そこで、本研究でイネいもち病菌に対し、マクロライド系抗生物質の中で比較的強い付着器分化阻害を示し、ヒトの治療薬にも用いられており、様々な知見の多い Roxithromycin (RXM) に注目し、解析を行った。

RXM はイネいもち病 (P2 株) に作用させると 100-200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではほぼ一定の付着器分化抑制効果が見られ、250 $\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度では強い生育抑制効果が見られた (Fig. 2)。この結果から 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で付着器分化抑制効果については閾値に達していることが予想され、イネいもち病菌において RXM は分化抑制に関与する標的と生育阻害に関与する標的の少なくとも 2 つの標的が存在していると考えられた。この標的分子を特定するため、ファージディスプレイ法を用いて解析を行った。

今回薬剤の標的探索に用いたファージディスプレイ法は抗体の作成に用いられるなど、応用範囲によっては信頼性も高く、また調べたい対象に結合するペプチドを提示するファージを単離するという方法のため、結合しているファージが 1 分子でも存在していれば増幅し、解析できることから非常に感度が高い。また、イネいもち病のゲノム DNA ライブラリーを用いたことで、時期特異的に発現する遺伝子も含めほとんどすべての遺伝子を解析できる系とした。

ファージディスプレイ法より RXM の標的候補分子として 30 以上のペプチド配列が得られたが、イネいもち病菌のタンパク質と高い相同性を示したのは 27-2、29-4、32-11、35-16 の 4 つのペプチドであった (Table 3)。このうち、29-4 と 35-16 は機能未知のタンパク質と相同性が高く、ヒトにおいて相同性の高いタンパク質は見られなかった。また、27-2 のペプチド配列はイネいもち病菌における DNA ポリメラーゼ DNA polymerase ϵ の触媒サブユニットと推定されたタンパク質と高い相同性を示した。DNA polymerase ϵ は DNA 損傷修復に関与するポリメラーゼであり、真核生物で広く保存されている (Kesti *et al.*, 1999)。また、

32-11 のペプチド配列はイネいもち病菌において CDC27 のホモログと推定される PoCdc27 の部分配列と 98%一致していた(Fig. 3)。イネいもち病菌において PoCdc27 の機能解析は行われていなかったが、CDC27 は酵母からヒトまで真核生物に広く保存されていることが報告されている (Yu, 2002, Thornton *et al.*, 2006, Peters, 2006)。一般に CDC27 はユビキチンリガーゼの 1 つである APC のサブユニットの 1 つで核分裂制御に関与している。もし PoCdc27 も細胞分裂制御に関与するならば付着器分化に関与している可能性が高いと考え、PoCdc27 に注目した。イネいもち病菌は付着器形成時に細胞分裂が起こることが知られており、ヒドロキシウレア等の DNA 合成阻害剤により DNA 複製を阻害すると付着器の形成が抑制される (Saunders *et al.*, 2010b)。また、イネいもち病菌において UEP1 や UEP3、PUB4 といったユビキチン関連遺伝子が付着器形成時に発現量に変化しており、植物への感染に関与することか示唆されている (McCafferty and Talbot, 1998)。実際 *PoCDC27* は発現特異性解析の結果、栄養菌糸成長時に比べ付着器形成時に強く発現しており、RXM による付着器分化抑制に関与する可能性があり、RXM の標的として期待できた (Fig. 4)。

今回 24 種類の薬剤のうち 10 種類がイネいもち病菌の付着器分化に影響を与えたことから付着器分化阻害を指標とした評価系は様々な薬剤の阻害効果の解析に有用であると共に、新たな効用の発見にも有用と考えられる。また、イネいもち病菌における付着器分化阻害の分子標的は付着器分化時に発現している可能性が高い。そのため、cDNA ライブラリーを使用する場合、付着器分化時の cDNA を利用する必要があるが、付着器分化時の RNA を大量に取得するのは難しい。今回ゲノムライブラリーを使用することで培養条件により発現が変動する遺伝子も解析できたことから、ゲノムライブラリーを使用できることは有用であると考えられる。

第3章 RXM 標的分子の解析

5. 諸言

RXM の既知の作用は 50S リボソームサブユニットに結合することでペプチド転移反応を阻害し、原核生物のタンパク質合成を阻害することである (Schlünzen *et al.*, 2001)。グラム陽性菌や一部のグラム陰性菌、マイコプラズマなどに効果があり、皮膚感染症、呼吸器感染症、耳鼻科感染症など広範囲の感染症の治療に用いられていた (Bryskier, 1998, Young *et al.*, 1989)。マクロライド系抗生物質には、IL-8 などのサイトカイン産生調節といった抗炎症作用やバイオフィーム形成抑制、アポトーシス誘導作用、血管新生の抑制など本来の作用点では考えられない新しい作用が次々と発見されている。しかし、これら真核生物に対する作用はモチリン様作用を除き作用規序は明らかになっていない (Gao *et al.*, 2007, Amsden, 2005, Aoki *et al.*, 2005, Ueno *et al.*, 2005, Ogawa *et al.*, 2003, Suzuki *et al.*, 1999, Yatsunami *et al.*, 1999, Kawasaki *et al.*, 1998, Ozeki *et al.*, 1996, Omura *et al.*, 1987)。特に抗炎症作用は最も注目されており、現在では抗生物質として以外に主に抗炎症剤としても治療に用いられている。このように RXM には真核生物に対し、有用な作用の標的分子が未解明であり、解明できればより効果の高い抗炎症剤等の開発に応用できると考え、作用点の解析を行った。

第1章で RXM の標的として注目した *P. oryzae* cell division cycle 27 homolog (PoCdc27) が高い相同性を示したヒト CDC27 は、有糸分裂後期チェックポイントを担うユビキチンリガーゼ Anaphase Promoting Complex (APC) の構成要素の一つとして働くことが知られている (Yu, 2002, Thornton *et al.*, 2006)。APC の構成サブユニットの多くは真核生物間で広く保存されており、CDC27 も酵母からヒトにまで広く保存されている (Tugendreich *et al.*, 1993, Zachariae *et al.*, 1996, Lamb *et al.*, 1994)。APC はヒトでは 12 のサブユニットから構成されており (Peters, 2006)、酵母においては 13 のサブユニットが確認されているなどその構成サブユニットは生物種により一部異なっている (Yoon *et al.* 2002)。その中で CDC27 はタンパク質結合ドメインである TPR (tetratricopeptide repeat domain) を持ち、APC と活性化補助因子として基質認識に関与する CDH1 と APC の結合に関与する足場として機能することが知られている (Vodermaier *et al.*, 2003)。APC は CDH1 や CDC20 と結合し、細胞周期進行を制御するサイクリン B のユビキチン化による分解により細胞周期制御を担う。また、セキュリンをユビキチン化し、セキュリンを分解してセパリンを遊離させる。遊離したセパリンによりコヒーシンが分解されることにより染色体が分かれることができるようになり、有糸分裂が終了する (Peters, 2006)。イネいもち病菌は、付着器を形成する際に細胞分裂を行うことが知られていることから (Saunders *et al.*, 2010a)、PoCdc27 は RXM によるイ

6. 材料及び方法

6.1 基本的な研究手法

6.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)の条件および使用したプライマー

PCR は Expand High Fidelity Plus PCR System (Roche, Mannheim, Germany) または *Taq* DNA Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)、特に正確性を要する場合や 6 kb 以上を増幅する場合は Phusion High-fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) を用いてそれぞれのプロトコールに従い、10-50 μ l の反応系で反応溶液を調製して行った。PCR サンプルを精製する場合は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, CA, USA) を用い、キット付属のプロトコールにしたがって実験を行った。

また、サザンハイブリダイゼーションのプローブ合成には dNTP として PCR DIG labeling mix (Roche) を使用し、キットのマニュアルに従い反応液を調製した。本研究で使用したプライマーを Table 4 に示した。

Table 4. Primers used in this chapter

Name	Sequence
PoCDC27 FL-F	TAGGGCCCAACTAGCGCGGATGTGATTA
PoCDC27 FL-R	GACTCGAGGATGAGCTTTGCGTAAGTAA
PoCDC27 FR-F	CCGATATCCTCGTGCGATTACTTTGACA
PoCDC27 FR-R	CCACTAGTGCGCTAACATTAGACCTTTG
FL probe F	CTCACAAACATTTTCAGTCAT
FL probe R	CTTTGCGTAAGTAAGTTAGG
PR-1	TGATGGGCTTGGAAGAGTGTTG
hphL-in	TTAGCCAGACGAGCGGGTTC
PoCDC27 L	AGCCTGGCACTTCTTCTCTG
Ptef-F	AGCAAACGGTGGTCAAAGGA
Ptef-R	GATATCGTTGACGGTGATGTATGGAA
UPstream	GTTGGTTGGGAAGTGAATGAATG
hph mid L	GAAGCAGCAGATGATAATAATGT
hph mid R	TGCACAGGTACACTTGTTTAGAG
PoCDC27 F	AACCCGGGATGGCACCTGGTAGCAGT
PoCDC27 R	ATCCCGGGCATCCTCGAGACTTTCTATG
PoCDC27 RTF	ATAAGAATACGGCGGTCCATC
PoCDC27 RTR	GGTAGCCCAAGAAAAGCAAC
GAPDH F	GACCGGAGGCGAGACTCA
GAPDH R	GCGTCGACGTTCCAGATGTA

6.1.2 ベクターの構築

PoCDC27 遺伝子破壊ベクター-pD20S の作成には、形質転換マーカーとして、hygromycinB に対する抵抗性を付与するためハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (hygromycin phosphotransferase gene: *hph*) 発現領域を持つプラスミドベクターである pCSN43 (Staben *et al.*, 1989) を用いた。*PoCDC27* 遺伝子上流領域 (FL; fragment left) 約 2.2 kb を PoCDC FL-F、PoCDC FL-R プライマーにより増幅し、pCSN43 の *ApaI-XhoI* サイトに導入した後、*PoCDC27* 遺伝子下流領域 (FR; fragment right) 約 1.9 kb を PoCDC FR-F、PoCDC FR-R プライマーで増幅し、pCSN43 の *EcoRV-SpeI* サイトに導入した。

また、過剰発現ベクター-pBF*tefPoCDC27* の構築のため、高発現プロモーターカセット導入ベクター-pCSN*tefXX* を作成した。pCSN*tefXX* は pCSN43 を *EcoRV* と *HindIII* で処理し、Klenow Fragment 処理により平滑化したものに pMK412 を鋳型に *Aureobasidium pullulans* 由来の translation enhance factor $\alpha 1$ (TEF) プロモーターを P*tef*-F、P*tef*-R プライマーペアにより増幅し、*EcoRV* で処理したものを導入した(Watanabe *et al.*, 2007)。pCSN *tefXX* の *SmaI* サイトに PoCDC27 F、PoCDC27 R プライマーにより増幅した *PoCDC27* 遺伝子を導入し、pCSN*tef20S* とした。pCSN*tef20S* から TEFp-*PoCDC27* 領域を *BamHI* で切り出し、抗生物質体制マーカーとして blastcidin S deaminase (BSD) 遺伝子発現カセットを持つ pBF101 の *BamHI* サイトに挿入し (Kimura *et al.*, 1994)、pBF*tefPoCDC27* とした。

タンパク発現用ベクター-pET-*PoCDC27* の作成には、まず pET15b (Novagen, WI, USA) の *BamHI* サイトに pCSN43 の MCS を *BamHI* で切り出し、導入した pET43A 作成した。*PoCDC27* 遺伝子を PoCDC27 F、PoCDC27 R プライマーにより増幅し、pET43A の *SmaI* サイトに導入することで pET-*PoCDC27* を作成した。

6.2 イネいもち病菌の形質転換

いもち病菌の形質転換は木村らの方法 (Kimura *et al.*, 1994) を一部改変して行った。平板培養したイネいもち病菌の菌叢 5 mm 四方断片を YG 液体培地に植菌し、28 °C で 2 日間振盪培養した (前培養)。その後、前培養液 3 ml を新たな YG 液体培地 100 ml に移し、同条件で一晩培養した後 (本培養)、培養液を 50 ml 容微量遠心管に移し、遠心分離 (2000×g, 10 min) により菌体を回収した。菌体を滅菌蒸留水で洗浄後、OM buffer (1.2 M MgSO₄, 10 mM Sodium phosphate buffer; pH 7.0) で再度洗浄した。その後、菌体約 1 g を新たな 15 ml 容微量遠心管に移し、フィルター滅菌 (Filter Unit pore size 0.45 μ m, MILLEX-HV, (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)) した酵素液 1 ml (30 mg/ml Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich)、10 mg/ml yatalase (TaKaRa) in OM buffer) を加え、28 °C、70 rpm 2.5 h で穏やかに振盪してプロトプラスト化を誘導した。プロトプラスト懸濁液に 1 ml の ST buffer (0.6 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl; pH 7.5) を静かに重層し、遠心分離 (4 °C, 2000

× g, 10 min) し、プロトプラストを境界面に集め回収した。回収したプロトプラストを STC buffer (1.2 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM CaCl₂) で洗浄後、STC buffer で 5×10^7 /ml 以上となるよう再懸濁した。調製済みプロトプラスト液 20 μ l を 1.5 ml 容微量遠心管に分注し、DNA を 5-8 μ l ずつ (DNA 量が 500 ng 程度となるよう) 加えた。形質転換用の DNA は添加前に 65 °C で 5 min 加熱殺菌した。DNA 添加後、プロトプラスト液に 60% PEG solution (60% [w/v] PEG4000 (和光純薬工業), 0.05 M CaCl₂, 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)) を 12.5 μ l ずつ 2 回に分けて (計 25 μ l) 重層した。室温で 20 min 静置後、STC-50 buffer (1.2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)) を 1 ml ずつ加え、転地攪拌した。その後、遠心分離 (4 °C, 7000 rpm, 10 min) してプロトプラストを沈殿させ、上清除去後、YG1/2SC 培地 (0.5% [w/v] Yeast Extract, 2.0% [w/v] glucose, 0.6 M sorbitol, 25 mM CaCl₂) 250 μ l に懸濁し、28 °C で 3-24 h 静置培養した。培養後、各サンプルをそれぞれシャーレに 25 μ l ずつ滴下し、選択培地を加え、混和して固めた。

選択培地は hygromycin の場合、終濃度 100 μ g/ml の hygromycin B (和光純薬工業) を添加した YG20S 寒天培地 (0.5% [w/v] Yeast extract, 2% [w/v] Glucose, 20% [w/v] Sucrose, 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業)) を使用し、28 °C で 4-6 日間 (生育の様子をみて) 静置培養した後、各培地に hygromycin B 添加 (終濃度 200 μ g/ml) YG 寒天培地を薄く重層した。その後、寒天の表面まで生育してきた菌株を hygromycin B 添加 (終濃度 100 μ g/ml) YG 寒天培地に移し生育したものを形質転換候補株とした。

Blasticidin の場合(Guy11 株)、終濃度 2 μ g/ml の Blasticidin S, Hydrochloride (フナコシ) を添加した BasicN20S (0.16% [w/v] yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), 0.1% [w/v] NH₄NO₃ (関東化学), 20% [w/v] Sucrose, 0.5% [w/v] Glucose, 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業)) を使用した。その後、寒天の表面まで生育してきた菌株を終濃度 5 μ g/ml の Blasticidin S, Hydrochloride を添加した BasicN 寒天培地(0.16% [w/v] yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate (Becton, Dickinson and Company), 0.1% [w/v] NH₄NO₃ (関東化学), 0.5% [w/v] Glucose, 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業))に移し生育したものを形質転換候補株とした。

Blasticidin の場合(P2 株)、終濃度 2 μ g/ml の Blasticidin S, Hydrochloride (フナコシ) を添加した BN20S (0.26% [w/v] yeast nitrogen base without amino acid (Becton, Dickinson and Company), 20% [w/v] Sucrose, 0.5% [w/v] Glucose, 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業))を使用した。その後、寒天の表面まで生育してきた菌株を終濃度 5 μ g/ml の Blasticidin S, Hydrochloride を添加した BN 寒天培地(0.26% [w/v] yeast nitrogen base without amino acid (Becton, Dickinson and Company), 0.5% [w/v] Glucose, 1.5% [w/v] agar (和光純薬工業))に移し生育したものを形質転換候補株とした。

6.3 サザンハイブリダイゼーション

サザンハイブリダイゼーションは DIG (ジゴキシゲニン) アプリケーションマニュアル for Filter Hybridization (Roche) を参考に行った。ゲノム DNA は適当な制限酵素で処理、電気泳動後、UV クロスリンカー (GS GENE LINKER UV CHAMBER, BIO-RAD) で処理し、ニックを入れた (60 mjoule, nick)。キャピラリー法 (バッファーは 20×SSC (3 M NaCl, 300 mM クエン酸ナトリウム)) によりナイロンメンブレン (Nylon Membranes, positive charge; Roche) に DNA を転写した (overnight)。UV クロスリンカーにより DNA をメンブレンに固定 (150 mjoule) し、プローブを 65 °C, over night で反応させた。DIG の検出には、アルカリホスファターゼ標識抗 DIG Fab フラグメント (Roche) を抗体として、CDP-Star (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を検出試薬として使用した。

検出後、ナイロンメンブレンを剥離バッファー(0.2 M NaOH, 0.1% [w/v] SDS)で65 °C、15minインキュベートを2回行い、2×SSC (0.3 M NaCl, 30 mM クエン酸ナトリウム) で洗浄を行い、プローブを剥離させ、別のプローブを用いて再度検出を行った。

FL probe、FR probe、PoCDC27 probe、PoCDC27-L probeはイネいもち病菌のゲノムDNAをテンプレートとしてそれぞれ FL probe F と FL probe R、PoCDC27 FR-FとPoCDC27 FR-R、PoCDC27 FとPoCDC27 R、PoCDC27 FとPoCDC27 L のプライマーの組み合わせでPCRにより合成した。また、hph-R probeはpCSN43をテンプレートにhphL-inとPR-1のプライマーを用いてPCRにより合成した。最後にtef probe はpCSNtefXXをテンプレートにPtef-FとPtef-Rのプライマーを用いてPCRにより合成した。

6.4 real time RT-PCR

Real time RT-PCR は 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使い、製品のマニュアルに従って行った。Real time RT-PCR は、インターカレーターとして SYBR Green I (Applied Biosystems)を用い、2ステップ法によって行った。反応溶液の組成は 20 µl 系で作成した。反応とデータの解析は結果 *GAPDH* 遺伝子の発現量を Internal Control として補正した。*PoCDC27* の増幅には PoCDC27 RT F と PoCDC27 RT R のプライマーペアを用い、*GAPDH* の増幅には *GAPDH*-F と *GAPDH*-R のプライマーペアを用いた。解析結果は野生株の栄養菌糸成長時 (VG) の値を 1 とした相対値で表示した。

6.5 タンパク質の調製

6.5.1 大腸菌によるタンパク質発現

大腸菌でのタンパク質の発現は pET-PoCDC27 (2.3.6 ベクターの構築) を用い、(2.3.1

大腸菌の形質転換)に従い、BL21 株由来の Rosetta (DE3) (F-, omp T, hsd S(rB-, mB-), gal, dcm, +pRARE (CmR)) に導入した。ベクターが導入された大腸菌を 100 µg/ml アンピシリン、30 µg/ml クロラムフェニコール添加 LB 液体培地 2 ml で 37 °C, over night 振盪培養した。培養液を 100 µg/ml アンピシリン添加 enrich 培地 (2% [w/v] trypton, 1% [w/v] yeast extract, 0.5% [w/v] NaCl, 0.4% [v/v] glycerol, 0.68 % [w/v] KH₂PO₄, 1% [w/v] glucose) に接種し、OD₆₀₀ が 0.4-0.6 になるまで 25 °C で培養した。そこに、IPTG を終濃度 0.5 µM になるように添加し、さらに 20 °C で 12 h 培養した。

培養後、遠心分離 (4 °C, 7000 rpm, 5 min) を行い、菌体を回収し、storage buffer (20 mM 2-mercapt ethanol, 50 mM Tris-HCl) で洗浄を行った。菌体を培養液の 100 分の 1 量の Lysis buffer (20 mM 2-mercapt ethanol, 3% [w/v] NaCl, 10% [v/v] glycerol, 25 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazole, protease inhibitor (cOmplete ULTRA mixture tablets, EDTA-free, Roche Applied Science)) で懸濁し、氷冷しながら超音波破碎機 (SONIFER 450, BRANSON, CT, USA) で破碎した。タンパク質抽出液を遠心分離 (4 °C, 15000 rpm, 15 min) 後、上清の可溶性画分を回収し、タンパク質粗精製液とした。

6.5.2 His tag タンパク質の精製

Ni ビーズとして Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を使用し、製品のマニュアルに従いタンパク質の精製を行った。タンパク質粗精製液と Ni ビーズとして Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を混合し、4°C で 1 h 攪拌し、ビーズに His tag タンパク質を吸着させた。ビーズを Lysis buffer (20 mM 2-mercapt ethanol, 3% [w/v] NaCl, 10% [v/v] glycerol, 25 mM Tris-HCl, 20 mM Imidazole) で洗浄し、Extraction buffer (20 mM 2-mercapt ethanol, 3% [w/v] NaCl, 10% [v/v] glycerol, 25 mM Tris-HCl, 400 mM Imidazole, protease inhibitor (cOmplete ULTRA mixture tablets, EDTA-free, Roche Applied Science)) で His tag タンパク質を溶出させた。

6.5.3 脱塩・バッファー交換

タンパク質抽出液のバッファー交換には PD-10 カラム (GE healthcare) を使用し、付属のマニュアルに従い操作を行った。His tag タンパク質を 2.5 ml となるよう希釈し、カラムに添加後、HBS buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl) を 3.5 ml 添加し、溶出液を回収した。

6.5.4 ウェスタンハイブリダイゼーション

タンパク質抽出液に 4×SDS-PAGE buffer (0.5 M Tris, 20 % [w/v] 2-Mercaptoetanol, 4 %

[w/v] SDS, 40 % [w/v] Glycerol; pH6.8) を 1/3 量添加し、5 分間 98°C で処理した後、7.5% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。

ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜 (Immobilon-P; ミリポア) へのトランスファーは、セミドライ方式のブロッター (SEMI-DRY TRANSFER CELL, BIO-RAD) を用いて行なった。SDS-PAGE 後のゲル、ろ紙は Transfer buffer に浸し、PVDF 膜はメタノールで処理してから Transfer buffer に浸して使用した。転写後、PVDF 膜を 5% [w/v] skim milk (Rche) / TBST (20mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% [v/v] Tween 20) でブロッキングを行った。その後、PVDF 膜を TBST で洗浄し、1% [w/v] スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) 入りの TBST で 1 次抗体 (anti His antibody (GE Healthcare)) を 3000 倍希釈した抗体溶液にメンブレンを浸し、1 次抗体を反応させた。

PVDF 膜を TBST で洗浄し、1% [w/v] スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) 入りの TBST で 6000 倍希釈した 2 次抗体 (goat-anti-mouse IgG-AP (Santa cruz Biotechnology, Inc, California, USA)) に浸した。再び TBST で PVDF 膜を洗浄し、CDP-Star を検出試薬として使い、ルミノ・イメージアナライザー LAS-3000 で可視化した。

6.6 表面プラズモン共鳴解析

タンパク質と薬剤の相互作用解析に表面プラズモン共鳴解析を用いた。解析には Biacore 3000 (GE Healthcare) を使い、マニュアルに従い操作を行った。センサーチップには Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) を使用し、チップ上に精製したタンパク質を固定した。アナライトには様々な濃度の RXM (Sigma-Aldrich) を添加した。RXM は DMSO に溶解し、DMSO が終濃度 5% となるよう調製した。解析には HBS-P buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% Tween 20) を使用し、DMSO を終濃度 5% となるよう添加した。コントロールとしてウシ由来アルブミン (BSA, Nacalai tesque) を使用した。

7. 結果

7.1 *PoCDC27* 遺伝子破壊株の作成

酵母において *CDC27* の破壊は致死形質となる (Giaever *et al.*,2002)。しかし、*PoCDC27* は DNA 配列情報に基づく予想であり、イネいもち病菌ではまだ機能解析が行なわれた報告がなかった。構造が酷似していても機能が異なる場合もあり、酵母同様この遺伝子の破壊が致死につながるとは限らないと考えた。また、ロックダウンを再現性良く行う手法がイネいもち病菌において確立されていないことから、まず *PoCDC27* 破壊ベクター pD20S を用いた 2 回相同組換えによる標的遺伝子破壊を試みた。親株には野生株 P2 株を使用した。得られた形質転換体約 200 株に対し、PCR で選抜後、*PoCDC27* 遺伝子上流側相同領域 (FL) に設計したプローブによるサザンハイブリダイゼーションを行い、相同組換えが起こったと考えられる変異株を取得した (DCP55) (Fig. 6)。また、pD20S ベクターが相同組換えによらず異所に挿入されたエクトピック株 (ECP1) も取得した。

得られた *pocdc27* 破壊候補株 (DCP55 株) について、*PoCDC27* 領域特異的プライマー (*PoCDC27* F、*PoCDC27* R) による PCR で、*PoCDC27* 遺伝子領域全長の増幅が確認できた (Data not shown)。そのため、この *pocdc27* 破壊候補株の構造を確認するため、4 か所にプローブを設計し、ゲノムを *Pst*I と *Bgl*III の 2 種類の酵素で切断し、サザン解析を行った (Fig. 6)。まず上流側相同領域 (FL) に設計したプローブで検出した結果、*pocdc27* 破壊候補株 (DCP55) では、約 4800 bp の組換え体で見られるバンドの他に約 10 kb 程度のバンドが検出された (Fig.6B)。しかし、下流側相同領域 (FR) に設計したプローブで検出した結果、*pocdc27* 破壊候補株 (DCP55) では、野生株 (P2) と同じ約 5400 bp のバンドと約 10 kb 程度のバンドが検出された (Fig. 6C)。さらに、*PoCDC27* 遺伝子特異的プローブ (*PoCDC27*-L probe) で検出した結果、*pocdc27* 破壊候補株 (DCP55) では野生株の約 5700 bp と異なる約 10 kb 程度の位置にバンドが検出された (Fig.6D)。また、形質転換体でのみ観察できる *hph* 領域特異的プローブ (*hph*-R probe) で検出したところ、*pocdc27* 破壊候補株 (DCP55) では約 10 kb 程度の位置にバンドが検出された (Fig.6E)。

以上の結果から *PoCDC27* 遺伝子上流部分では相同組換えが起きており、下流側の相同領域では組換えが起きておらず、いずれのプローブで検出しても約 10 kb の位置に同じバンドが検出された。これらの条件を満たすモデルとして、*PoCDC27* 遺伝子上流部分でゲノムと pD20S ベクター間で相同組換えが起き、生じた DNA 末端同士が DNA 修復機構により非相同末端結合によりつながった構造をしていると予測した (Fig. 7A)。そこで、*PoCDC27* 遺伝子領域に設計したプライマー (*PoCDC27* R) と *hph* 領域に設計したプライマー (*hph* mid R) を用い、PCR により *hph*-*PoCDC27* 領域を増幅したところ、*pocdc27* 破壊候補株 (DCP55) では予想通りの約 8 kb の増幅産物が得られた (Fig. 7B)。完全な *pocdc27* 遺伝子破壊株が得

られなかったため、DCP55 株を *pocdc27* 変異株として解析を行うこととした。また、外国産野生株である Guy11 を親株に、P2 株と同様に *pocdc27* 破壊株作成を試みたが、同様の構造の変異株が得られ、完全な破壊株は得られなかった (Data not shown)。

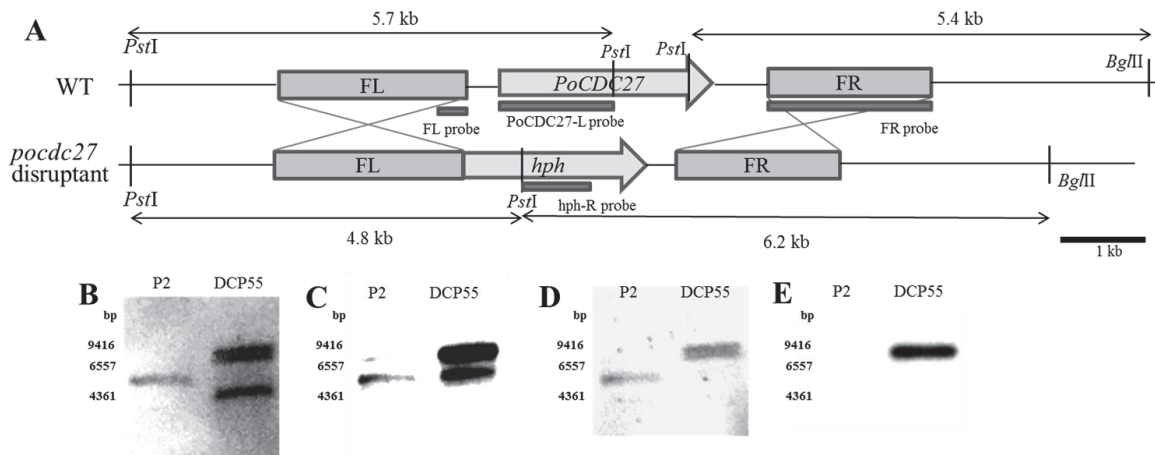


Fig. 6 Determination of the Genomic Structure of *pocdc27* Mutant DCP55.

(A) Schematic representation of *PoCDC27* gene replacement. The FL area indicates the 5' flanking region, and FR indicates the 3' flanking region of *PoCDC27*. (B-E) Southern blot analyses of the *pocdc27* mutant were done. Genomic DNAs were digested with *Pst*I and *Bgl*II and hybridized with Dig-labeled DNA probes to determine the genomic structure of the mutant. Hybridizations were carried out using the FL probe (B), the FR probe (C), the *PoCDC27*-L probe (D), and the *hph*-R probe (E).

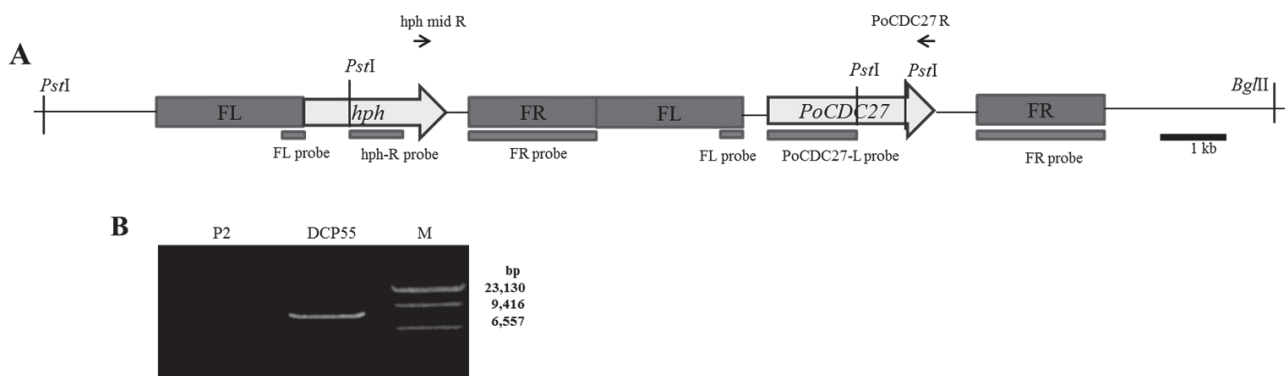


Fig. 7 Physical Structure of DCP55 As Revealed by PCR and Southern Hybridization.

(A) Model of the structure of *pocdc27* mutant DCP55. Arrows indicate the primers to amplify the *hph*-*PoCDC27* region. In the *pocdc27* mutant, the upstream region of *PoCDC27* was replaced by pD20S replacement vector, whereas the downstream of the gene was not rearranged. (B) PCR analysis was carried out with the *hph* specific primer and the *PoCDC27* specific primer. The 3' and the 5' regions of PCR products were sequenced. M, λ *Hind*III marker.

7.2 リアルタイム RT-PCR による *PoCDC27* の発現解析

今回得られた *pocdc27* 変異株は *PoCDC27* 遺伝子上流領域に変化があると示唆された。多くの遺伝子の制御領域は遺伝子上流領域に存在することから、発現制御に変化がある可能性があると考え、リアルタイム RT-PCR により付着器形成時 (AF) と栄養菌糸時 (VG) の *PoCDC27* 発現量を野生株と比較した。

栄養菌糸成長時を比較すると野生株と *pocdc27* 変異株に大きな差は見られないが、付着器形成時の *PoCDC27* 発現量を比較すると、野生株では栄養菌糸成長時に比べ、大きく発現量が上昇しているのに対し、変異株では野生株に比べ *PoCDC27* 遺伝子の発現量の上昇がほとんど見られないことがわかった (Fig. 8)。Guy11 株についてもリアルタイム RT-PCR を行ったところ、Guy11 株由来の *pocdc27* 変異株でも付着器形成時では野生株に比べ *PoCDC27* 遺伝子の発現量が大きく低下していた。以上の結果から以降これら *pocdc27* 変異株を *pocdc27* ノックダウン株と呼ぶこととした。

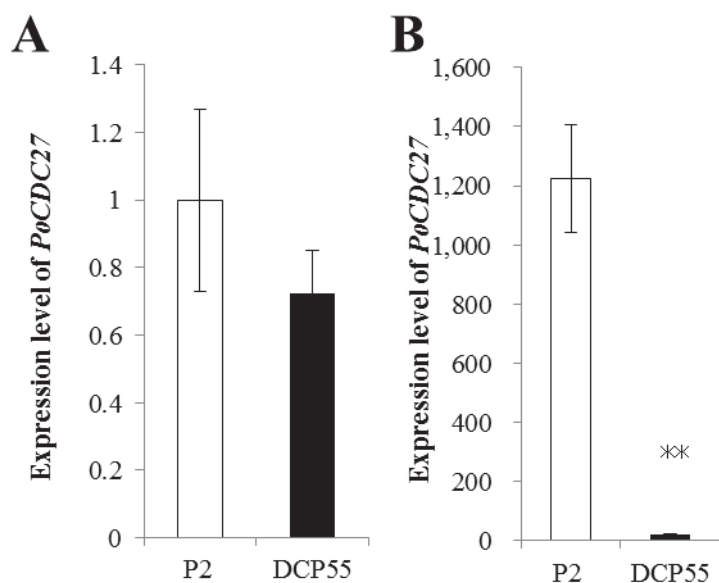


Fig. 8 Expression Properties of the *PoCDC27* Gene in *pocdc27* Mutant DCP55.

RNA was extracted from vegetatively growing mycelia (VG) (A) and appressorium forming germ tubes (AF) (B) of *pocdc27* mutant DCP55 and the wild type respectively. Expression levels were quantified by real-time RT-PCR and were normalized to the *P. oryzae* *GAPDH* mRNA. The relative index compared with wild type under VG condition is displayed. ** $p < 0.01$ compared to the wild-type

7.3 *pocdc27* ノックダウン株の付着器アッセイ

もし RXM が PoCdc27 の機能を阻害することが RXM による付着器形成阻害の原因であるなら、*PoCDC27* 発現量の低下により付着器形成が抑制されるのではないかと考えられた。そこで *pocdc27* ノックダウン株の付着器形成能及び発芽管形成能を調べた (Fig. 9)。

pocdc27 ノックダウン株 (DCP55) 株は RXM 未添加の状態では野生株と比較して付着器形成能に変化がなかった。しかし、野生株 (P2) および *ectopic* 株 (ECP1) で付着器形成が阻害される濃度の RXM (100 $\mu\text{g/ml}$) を添加してもノックダウン株 (DCP55) では付着器形成の抑制は見られなかった (Fig. 9B)。この結果から RXM は PoCdc27 の機能を阻害しているのではないことが予想された。しかし、PoCdc27 の減少により RXM に対する感受性が低下したことから、PoCdc27 が RXM の作用に関与している事が示唆された。

さらに、イネいもち病菌において生育阻害が引き起こされる濃度の RXM (250 $\mu\text{g/ml}$) を添加すると *pocdc27* ノックダウン株 (DCP55) 株においても野生株と同程度の生育阻害が見られた (Fig. 9)。この結果から、イネいもち病菌に対する RXM の生育阻害作用に PoCdc27 は関与していない可能性が考えられた。

また、Guy11 株についても同様に野生株で付着器形成率の低下が確認できる濃度の RXM を添加してもノックダウン株は付着器形成が抑制されず、生育阻害が引き起こされる濃度の RXM を添加すると野生株と同程度の生育阻害が観察された。

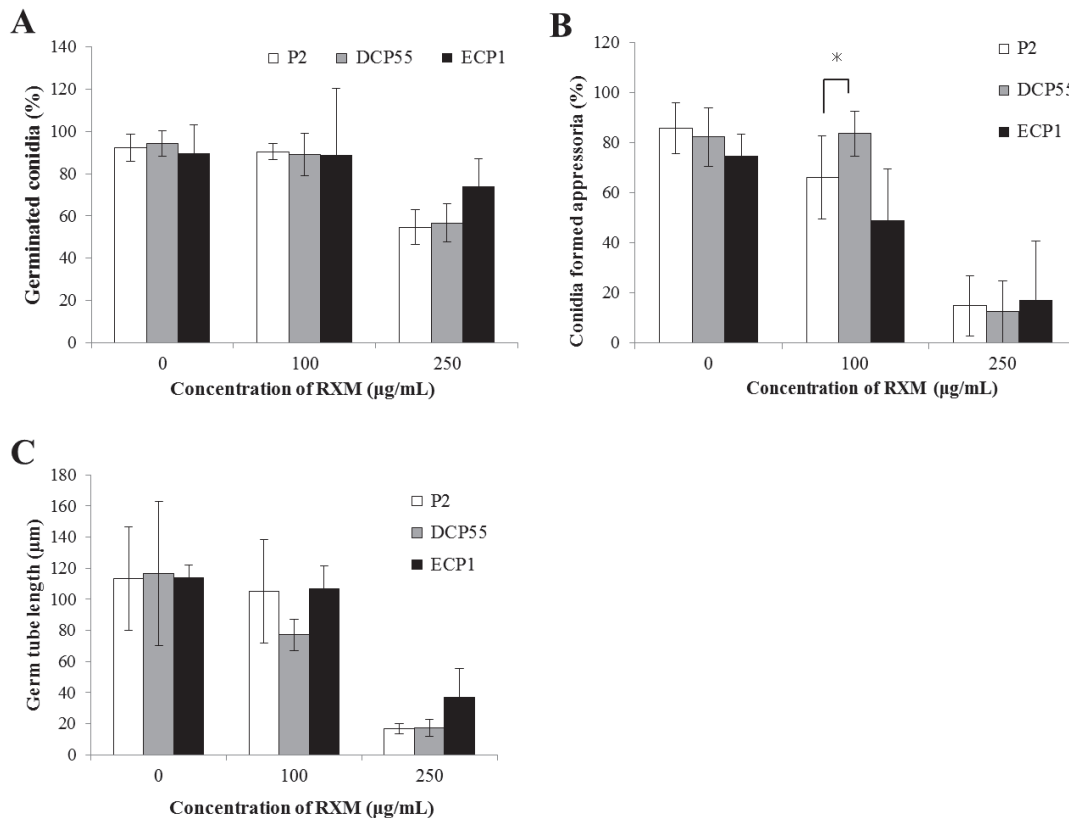


Fig. 9 Germination and Appressorium Formation in *pocdc27* Mutant Strain DCP55, Ectopic Strain ECP1, and Wild Type P2.

The frequency of germinating conidia (A) and appressorium formation (B), and the length of germ tubes (C) were quantified after 6 h of induction on microscope cover slips treated with various concentrations of RXM. * $p < 0.05$ compared to the wild type.

7.4 *PoCDC27* 過剰発現株の作成

RXMがPoCdc27の機能を阻害すると仮定するとPoCdc27が過剰に存在していれば、RXMを添加した際に野生株に比べ、RXMに結合していないPoCdc27の割合が多くなり、RXMによる付着器分化阻害効果が低下すると考えられる。そこで過剰発現株を作成し、RXMの影響を調べることにした。過剰発現用のプロモーターは糸状菌で高発現することが知られている *Aureobasidium pullulans* 由来の translation enhance factor $\alpha 1$ (TEF) プロモーター (*Ptef*) を使用した (Watanabe *et al.*, 2007)。

過剰発現ベクター *pBFtefPoCDC27* をイネいもち病菌 P2 株に導入し、*PoCDC27* 過剰発現株 2 株 (PT1-1、PT6-1) を取得した (Fig. 10)。過剰発現株はサザンハイブリダイゼーションにより TEF プロモーター領域に設計したプローブで検出し、それぞれの株で異なる位置に *pBFtefPoCDC27* が挿入されていることを確認した (Fig. 10B)。さらに、各過剰発現株における *PoCDC27* の発現量を RT-PCR により比較したところ、いずれの過剰発現株も野生株に比べ *PoCDC27* 発現量が増加していることが確認できた (Fig. 10C)。

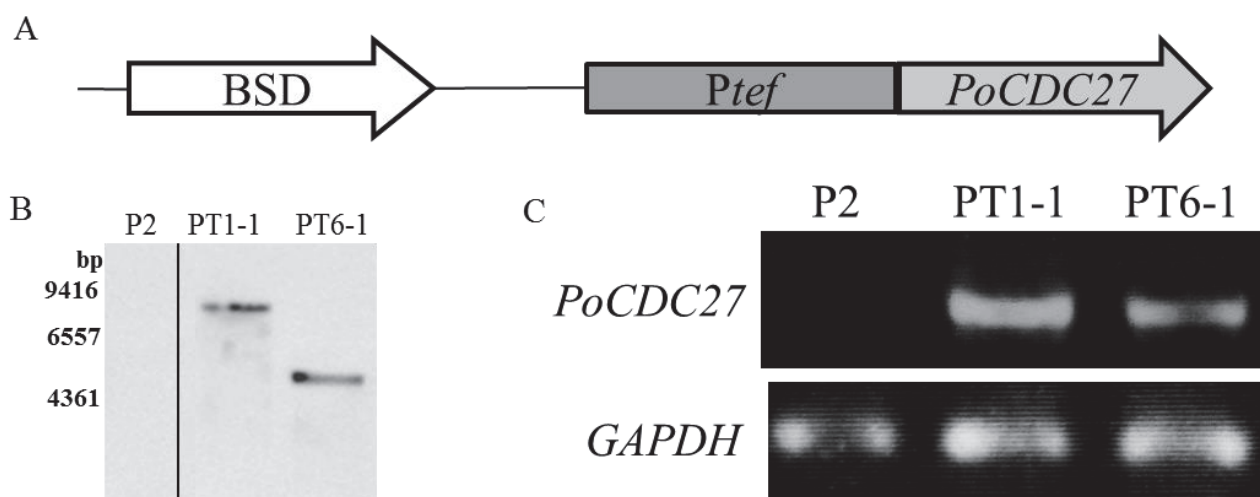


Fig. 10 Construction of *PoCDC27* overexpression mutants.

(A) Schematic representation of *PoCDC27* overexpression cassette. *PoCDC27* gene was placed downstream of the constitutive TEF promoter. (B) *PoCDC27* overexpression mutants (PCT1-1, PCT6-1) were detected by Southern blot analysis using the *tef* probe designed in *Ptef* region. The genomic DNA was digested with *Sph*I. (C) The mRNA level of *PoCDC27* in *PoCDC27* overexpression mutants were compared with P2 by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from vegetatively growing mycelia (VG). The expression of *GAPDH* was used as internal control.

7.5 *PoCDC27* 過剰発現株の付着器アッセイと RXM の効果

得られた *PoCDC27* 過剰発現株について発芽能や付着器形成能、RXM の効果を野生株 P2 と比較した (Fig. 11)。*PoCDC27* 過剰発現株では RXM 未添加時には野生株と同程度の発芽能、付着器形成能を示し、低濃度の RXM (100 μ g/ml) を添加しても野生株同様に付着器分化が阻害され、生育阻害は観察されなかった。しかし、過剰濃度の RXM (250 μ g/ml) を添加すると過剰発現株 PT1-1 と PT6-1 の両方で野生株と比較して RXM による発芽管伸長阻害が緩和され、PT6-1 ではさらに RXM による発芽阻害が緩和された。Guy11 株についても *PoCDC27* 過剰株を作成し、解析した結果、やはりこちらも RXM による付着器分化抑制には影響しないが、生育抑制が緩和された。また、Guy11 株だけでしか確認できておらず、試行回数も少ないことから参考データではあるが、野生株で付着器分化が阻害されない濃度の RXM (150 μ g/ml) を作用させると *PoCDC27* 過剰発現株では付着器分化が抑制された (Fig. 12)。

これらの結果から *pocdc27* ノックダウン株での結論と同様、RXM は PoCdc27 の機能を阻害することで付着器分化を阻害したのではないことが示唆された。しかし、*PoCDC27* 過剰発現株では RXM による生育阻害作用が緩和した。さらに付着器分化抑制作用について *PoCDC27* 過剰発現株では野生株に比べより低濃度の RXM に感受性を示す傾向が見られた。

生育阻害と分化阻害では *PoCDC27* 過剰発現株の反応が異なることから 2 つの阻害効果の作用点が異なる可能性が考えられた。また、生育阻害作用について注目すると、*PoCdc7* は RXM による生育阻害作用に関与する或は、生育阻害の標的ではないが *PoCdc27* が大量に存在したことで *PoCdc27* に結合する RXM が増え、結果的に生育阻害に関与する他の作用点に結合できる RXM が減少したことで生育阻害が緩和されたということが考えられる。

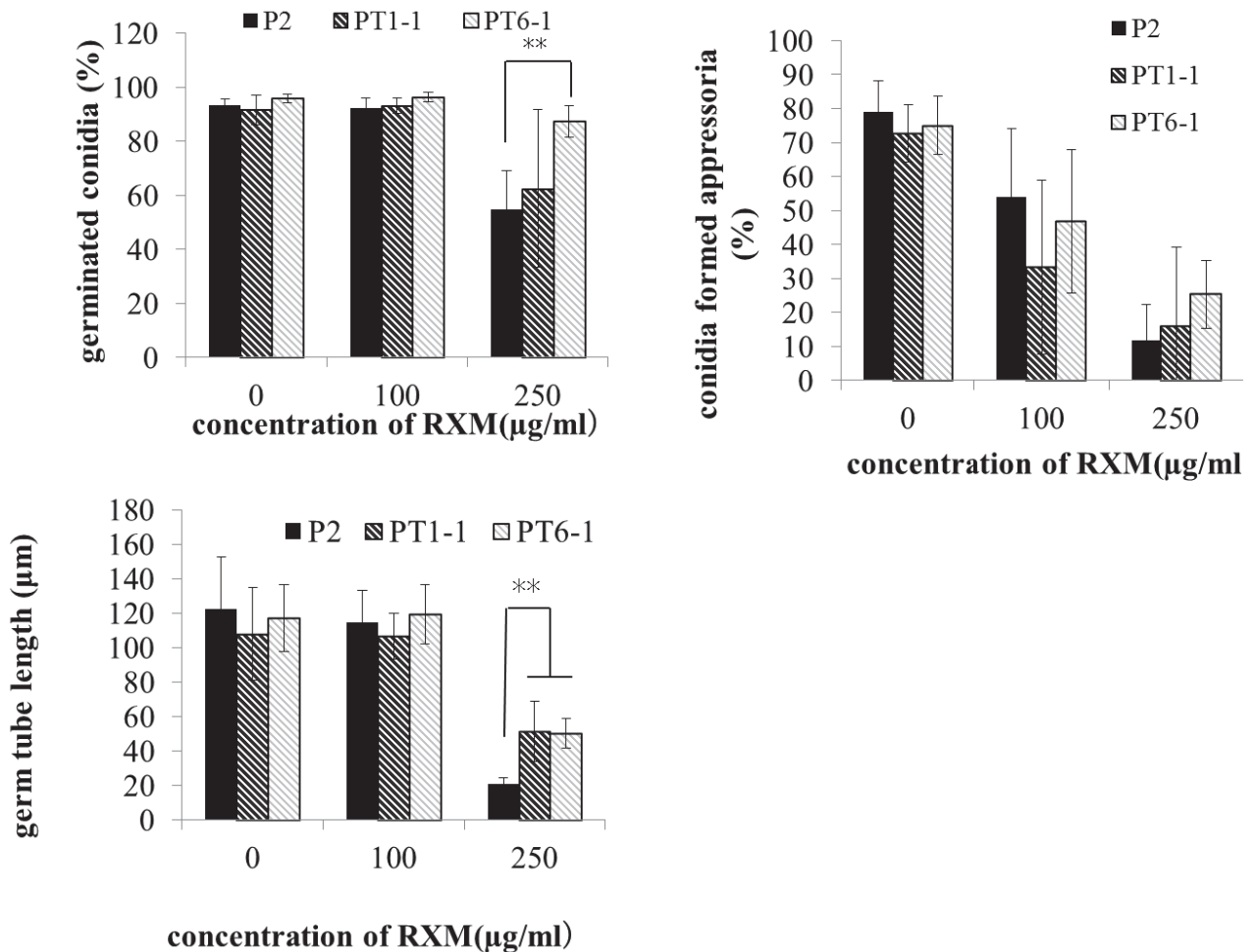


Fig. 11 Germination and Appressorium Formation in *PoCDC27* overexpression mutants (PT1-1 and PT6-1) and Wild Type P2.

The frequency of germinating conidia (A) and appressorium formation (B), and the length of germ tubes (C) were quantified after 6 h of induction on microscope cover slips treated with various concentrations of RXM. ** $p < 0.01$ compared to the wild type.

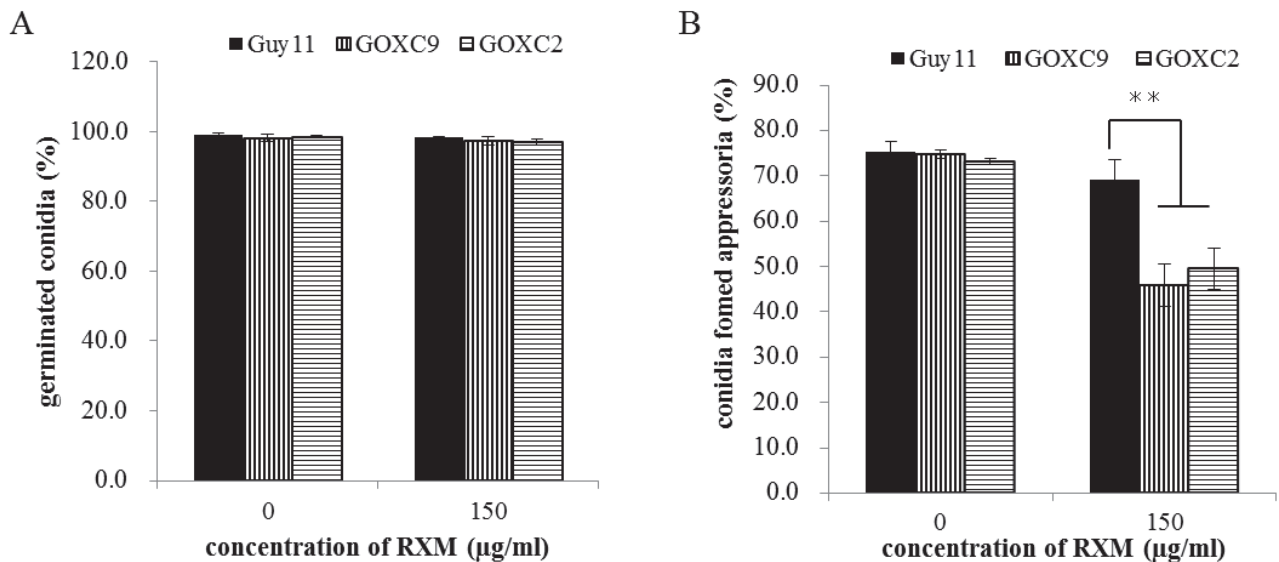


Fig. 12 Effect of low concentration of RXM on *PoCDC27* overexpression mutants (GOXC9 and GOXC2) and Wild Type Guy11. .

Bar charts illustrating the frequency of germinating conidia (A) and appressorium development (B) were quantified after 6 h of incubation on microscope cover slips. Conidia of each strain were treated with 0 µg/mL (1% ethanol) or 150 µg/mL RXM. ** $p < 0.01$ compared to Guy11.

7.6 *PoCDC27* 相補株の作成

pocdc27 ノックダウン株と *PoCDC27* 過剰発現株の結果より *PoCdc27* が減少していると RXM 感受性が減少し、*PoCdc27* が過剰に存在していても RXM の付着器分化抑制効果に影響がないことが示唆された。これらの結果と矛盾しない RXM の作用モデルとして RXM による付着器分化阻害には *PoCdc27* が存在していることが必要なのではないかと考えた。この仮定が正しいなら *PoCDC27* 発現量の減少した *pocdc27* ノックダウン株において *PoCDC27* を過剰発現させることで RXM 感受性が回復するのではないかと考えた。そこで、*pocdc27* ノックダウン株 (DCP55) に *PoCDC27* 過剰発現ベクター (pBFtef*PoCDC27*) を導入することで *PoCDC27* 相補株を作成した。作成した相補株 (PCT1-1) について、サザンハイブリダイゼーションにより TEF プロモーター領域に設計したプローブで過剰発現ベクター pBFtef*PoCDC27* が挿入されていることを確認し (Fig. 13A)、PCR によって *tef* プロモーターから *PoCDC27* 遺伝子全長が増幅できることを確認した (Data not shown)。また、*PoCDC27* の発現量を RT-PCR により比較したところ、野生株 P2、*pocdc27* 変異株 (DCP55) に比べ、*PoCDC27* 相補株 (PCT1-1) では *PoCDC27* 発現量が増加していることが確認できた (Fig. 13B)。

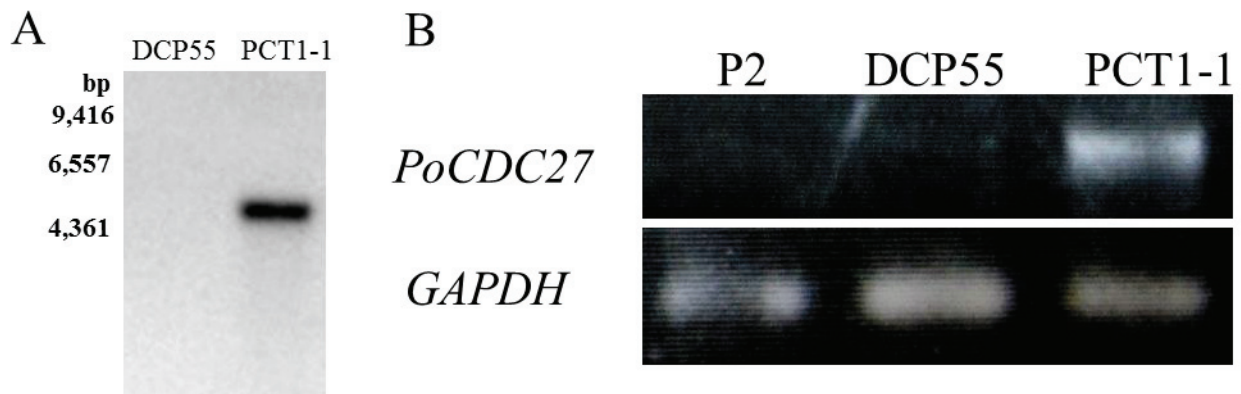


Fig. 13 Construction of *PoCDC27* Complemented Strain PCT1-1.

(A) PCT1-1 was detected by Southern blot analysis using the *tef* probe designed in *Ptef* region. The genomic DNA was digested with *Sph*I. (B) The mRNA level of *PoCDC27* in complemented strain PCT1-1 was compared with P2 and DCP55 by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from vegetatively growing mycelia (VG). The expression of *GAPDH* was used as internal control.

7.7 *PoCDC27* 相補株の付着器アッセイと RXM の効果

PoCdc27 が RXM の標的として付着器分化抑制に関与しているのかを調べるため、野生株、*pocdc27* ノックダウン株、*PoCDC27* 相補株の 3 株で付着器形成能、発芽能、RXM 感受性を比較した。その結果 RXM 非添加時、3 株間で違いは観察されず、低濃度の RXM (100 μ g/ml) 添加で *pocdc27* ノックダウン株は付着器分化が抑制されないが、相補株では野生株と同程度まで付着器分化が抑制された (Fig. 14)。*pocdc27* ノックダウン株において *PoCDC27* を過剰発現させたことで RXM 感受性が回復したことから、RXM による付着器分化阻害には *PoCdc27* の存在が重要であることが示唆された。

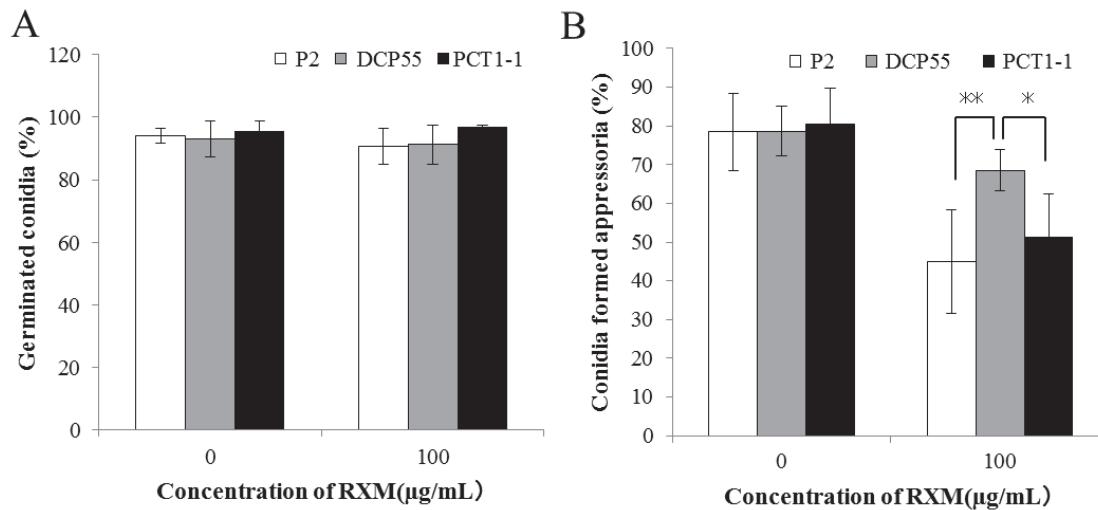


Fig. 14 Frequency of Conidial Germination and Appressorium Formation in *PoCDC27* Complemented Strain PCT1-1 Derived from DCP55.

Bar charts illustrating the frequency of germinating conidia (A) and appressorium development (B) were quantified after 6 h of incubation on microscope cover slips. Conidia of each strain were treated with 0 µg/mL (1% ethanol) or 100 µg/mL RXM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to DCP55.

7.8 PoCdc27 のタンパク質と RXM の相互作用解析

ここまでイネいもち病菌の付着器分化を利用した解析で、RXM が *PoCDC27* に作用している可能性が示唆された。そこで、表面プラズモン共鳴解析により直接 RXM と PoCdc27 の結合解析を行うことで PoCdc27 が RXM の標的分子であるか検証することにした。大腸菌によるタンパク質大量発現系を用いて His-tag 融合 PoCdc27 タンパク質の大量発現を行い、Ni ビーズを用いた精製を行った。得られたタンパク質をセンサーチップに固定し、表面プラズモン共鳴解析を行った。RXM を様々な濃度で添加すると、濃度依存的な吸着が見られ、結合定数は $1.06 \times 10^{-5} \text{M}$ であった (Fig. 15A)。コントロールとして使用した BSA では RXM の濃度依存的吸着は見られなかった (Fig. 15B)。以上の結果から比較的弱い相互作用ではあるが PoCdc27 は RXM の標的になり得ると考えられる。

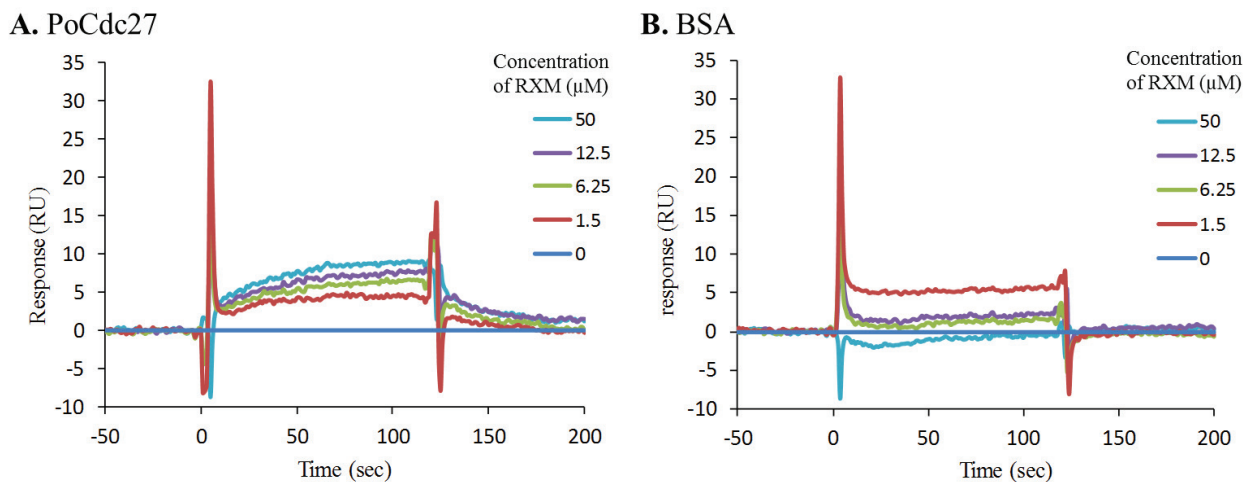


Fig. 15 Sensorgrams of RXM binding to PoCdc27 measured by surface plasmon resonance. PoCdc27(A) and BSA(B) was immobilized to the CM5 Chip Surface by Amine Coupling. Sensorgrams were recorded in the presence of various concentrations of RXM.

8. 考察

薬剤の最も一般的な作用機序としては、薬剤が標的分子に結合し、機能を阻害することがあげられる (Cohen, 2002, Jones *et al.*, 1999)。そのため、RXM が PoCdc27 の機能を阻害することで付着器分化を阻害したと仮定すると PoCdc27 の発現量が低下或はなくなれば付着器分化が抑制され、PoCdc27 が過剰量存在すれば標的が多くなり、薬剤の阻害を受けない分子の割合が高くなることで薬剤による阻害効果が緩和されると考えた。そこで、PoCDC27 遺伝子について変異株を作成し、作用機序の解明を目指した。

2回相同組換えによる *PoCDC27* 遺伝子破壊を試みたところ形質転換体 200 株以上解析しても遺伝子部分が完全に欠損した株は得られず、破壊株の形質が致死である可能性があった。イネいもち病菌は通常ハプロイドの状態通常生育しており、今回野生株として用いた P2 株等多くの株で有性生殖が確認されていないなど条件致死を証明する良い系が構築されていない。そのため、生育に必須な遺伝子である事の証明は難しく、今回のようにノックアウト株が通常の頻度の範囲で得られない場合にはその遺伝子の破壊は致死であると推定されることが多い。また、*PoCDC27* はデータベース上で *CDC27* のホモログと推定された遺伝子であり、酵母では *CDC27* 破壊株は G2 期で生育を停止し、致死となることが報告されている (Hartwell *et al.*, 1973)。また、酵母の他にも真菌では *Aspergillus nidulans* でも *CDC27* は細胞分裂に必須であることが報告されている (O'Donnell *et al.*, 1991)。さらに、一般に *CDC27* 同様、APC の構成サブユニットの多くは生育に必須であることが知られている (Passmore, 2004, Kramer *et al.*, 1998, Yamada *et al.*, 1997)。イネいもち病菌においても APC の他のサブユニットのホモログと推定された *block in mitosis 1 (BIMI)* の温度感受性変異株が作成されており、制限温度化では生育できないことから、生育に必須な遺伝子であると推定されている (Saunders *et al.*, 2010a)。こういった理由から *PoCDC27* についても生育に必須である可能性が高いと考えられた。今回、完全な破壊株は作成できなかったが付着器形成時に *PoCDC27* 発現レベルが野生株に比べて低いノックダウン株を取得できた (Fig. 6)。この変異株はサザンハイブリダイゼーション解析の結果、*PoCDC27* の上流領域が組換えにより変化した構造であることが示唆された (Fig. 7)。このような構造になった理由として、まず *PoCDC27* の上流側相同領域 (FL) でゲノムと *PoCDC27* 遺伝子破壊ベクター (pD20S) 間で相同組換えが起き、生じたゲノム末端とベクターの末端が非相同末端結合により修復されたと考えれば説明がつく (Krappmann, 2007)。今回得られた *pocdc27* ノックダウン株は、栄養菌糸成長時には *PoCDC27* の発現量が野生株と同程度であったため、生育には影響がなかったと考えられる (Fig. 8)。しかし、野生株では付着器形成時に *PoCDC27* の発現量が菌糸成長時に比べ大幅に上昇したのに対し、*pocdc27* ノックダウン株ではほとんど上昇していなかった。この結果から *PoCDC27* について遺伝子の上流に発現

制御領域が存在することが示唆された。この *pocdc27* ノックダウン株を破壊株の代わりとして解析を進めた。また、高発現プロモーターとして知られる *Aureobasidium pullulans* 由来の translation enhance factor $\alpha 1$ (TEF) プロモーター (Thornewell *et al.*, 1995) の下流に *PoCDC27* を挿入した過剰発現株 (PT1-1、PT6-1) を作成した (Fig. 10)。

ノックダウン株、過剰発現株の解析の結果、予想とは異なり *pocdc27* ノックダウン株では通常の発芽管形成能、付着器形成能に変化はなく、付着器分化を抑制する濃度の RXM (100 $\mu\text{g/ml}$) に対し感受性が低下していた (Fig. 9)。また、過剰発現株では RXM による付着器分化阻害作用に野生株との違いは見られなかった (Fig. 11)。さらに、Guy11 株を親株とした過剰発現株では野生株より低濃度の RXM で付着器分化が抑制される傾向にあった (Fig. 12)。これらの結果から、作用機序は予想とは異なり、RXM による単純な PoCdc27 の阻害ではないことが示唆された。また、*pocdc27* ノックダウン株と *PoCDC27* 過剰発現株の両方について生育阻害と分化阻害に対する反応が異なっていた。特に過剰発現株では生育阻害は緩和されるが付着器分化阻害はより強くなる傾向にあった。そのため RXM による生育阻害と分化阻害はそれぞれ標的分子が異なる可能性も考えられた。そこで、新たな作用モデルとしてまず付着器分化阻害について以下の 3 つのモデルを考えた。1 つは「RXM は PoCdc27 に作用し、機能を活性化させることで付着器分化を抑制する」というモデルである。しかし、*PoCDC27* 過剰発現株で RXM 未添加時に付着器形成が抑制されなかったことから単純に機能を活性化しているとは考えにくいと判断した。次に 2 つ目として「RXM は PoCdc27 の機能を阻害するが、ノックダウン株では他の因子が相補していた」という可能性が考えられた。しかし、この場合 *PoCDC27* 過剰発現株で RXM の効果が緩和されると考えられるが、実際は RXM による付着器分化抑制効果に野生株との差は見られなかった。3 つ目として「薬剤が直接 PoCdc27 に作用し、機能を阻害しているのではなく、RXM と PoCdc27 が結合して他の因子の働きに影響することで付着器形成能を低下させている」という可能性が考えられた (Fig. 16)。このモデルでは今回得られた結果に矛盾しない。

この仮定を確認するため *pocdc27* ノックダウン株に *PoCDC27* 過剰発現ベクターを導入した相補株を作成し、解析を行った。相補株では RXM による付着器分化阻害効果について野生株と同程度まで感受性が回復していた (Fig. 13, 14)。この結果からも薬剤と PoCdc27 が共に存在することで他の因子に作用し、付着器形成抑制効果を示すということが予想された。このモデルでは、PoCdc27 自体は付着器形成には直接関与していない可能性が考えられる。イネいもち病菌では M 期に移行できれば付着器分化が誘導されるという報告があり、PoCdc27 が APC に関与している場合、この知見とも一致する (Saunders *et al.*, 2010a)。このような効果は比較的珍しいが、免疫抑制剤として使用されているシクロスポリン A (CsA) も標的であるシクロフィリンと複合体を形成し、カルシニューリンとカルモジュリン、カルシウムイオンの相互作用を阻害するという報告がある (Liu J *et al.*, 1991)。この

シクロフィリンは、CsA が作用していないと蛋白質中のプロリンペプチド結合の異性化を促進するペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ (PPIase) として機能していることが知られている (Fischer *et al.*, 1998)。また、サリドマイドは今回想定された RXM の作用モデルに近い作用機序を持つことが報告されている。サリドマイドはユビキチンリガーゼであるセレブロンに結合し、セレブロンの機能を阻害すると共にユビキチン化の標的を変化させることで薬理効果を示すことが報告されている (Chang and Stewart, 2011)。

また、本研究で観察された RXM によるイネいもち病菌の生育阻害について、付着器分化阻害とは別の作用点が存在することが考えられた。イネいもち病菌の生育を阻害する高濃度の RXM を添加した場合、*pocdc27* ノックダウン株では野生株との差が見られず、*PoCDC27* 過剰発現株では生育阻害効果が緩和された。さらに、RXM 未添加時にはどちらの株も野生株と比べ発芽能に顕著な差がなかった (Fig. 9, 11)。これらの結果から、生育阻害についても RXM が *PoCdc27* に作用したことが原因と仮定すると矛盾なく説明できるモデルがなかった。そこで、*PoCdc27* は RXM と結合するが生育抑制作用には関与しないと考えられた。この場合、過剰発現株で RXM による生育阻害が緩和された理由として、過剰に存在する *PoCdc27* と結合することで遊離の RXM が少なくなり、生育阻害に関与する標的に作用する RXM が減少し、生育阻害が緩和されたと考えれば今回得られたデータと矛盾しない。

表面プラズモン共鳴解析の結果でも、結合定数は $1.06 \times 10^{-5} \text{M}$ 程度の比較的弱い結合であったが RXM と *PoCdc27* の相互作用が検出できた (Fig. 15)。これにより、*PoCdc27* は RXM と直接相互作用することが示唆され、RXM の標的である可能性が考えられた。

本研究で RXM の標的である可能性が示唆された *PoCdc27* は配列情報から TPR ドメインを持つと考えられている。ヒトにおいて CDC27 は TPR ドメインを介して APC とその活性化補助因子である CDH1 の結合の足場になることが知られており (Vodermaier *et al.*, 2003)、タンパク質との結合が機能に重要な役割をはたしている。このことから *PoCdc27* も TPR を介して他のタンパク質に作用している可能性があり、CsA やセレブロンの例と同様に *PoCdc27* は RXM と複合体を形成し、構造が変化することで通常とは異なる因子に作用している可能性も十分考えられる (Fig. 16)。しかし、*PoCdc27* の機能はまだ解析されておらず、APC の構成要素であるかの分かっていない。RXM がイネいもち病菌において APC に作用するののかについてはさらなる解析が必要である。ただし、もし *PoCdc27* が APC に関与し、RXM が APC に作用すると仮定すると、*PoCDC27* 過剰発現株でより低濃度の RXM により付着器分化が阻害される傾向にあったことに矛盾する (Fig. 12)。そのため、APC ではなく *PoCdc27* が単独で RXM に作用している可能性も考えられたが本研究では RXM の作用に APC が関与するか解明することはできなかった。

RXM の標的として解析した *PoCdc27* はヒトの CDC27 とタンパク質レベルで 30% の相同

性を示し、CDC27 は真核生物で広く保存されていることから CDC27 は真核生物に共通の RXM の標的である可能性は否定できない。しかし、本研究ではヒト CDC27 について RXM の標的となりうるか解析できなかった。CDC27 は細胞分裂に関与することから RXM による抗ガン作用の標的になり得る可能性がある。また近年、ヒト培養細胞などを用いた研究で CDC27 はクルクミンによる抗ガン作用の標的であることが示唆され、さらに APC は神経細胞の神経突起伸長、シロイヌナズナにおける花芽形成、*Candida albicans* の菌糸形態変化といった細胞分化に関与するという報告があり、RXM の作用である抗ガン作用や血管新生抑制作用といった作用との関連例が見られる (Manchado *et al.*, 2010, Chou *et al.*, 2011, Blilou *et al.*, 2002)。また、APC は TGF- β のシグナルの下流で機能することが報告されており (Zhang *et al.*, 2011)、炎症作用に重要なサイトカインが TGF- β のシグナルに関与していることから RXM による抗炎症作用にも CDC27 は関与し得る可能性があった。今後ヒト CDC27 について解析を行うことでヒトにおける RXM の作用点解明につながる可能性がある。真菌である酵母が真核生物のモデルであるようにヒトと真菌は共通の細胞内システムを持っていることは多く、本手法はイネいもち病菌における作用点探索だけでなく、ヒトにおける薬剤作用点解析にも有用である可能性があると考えられる。

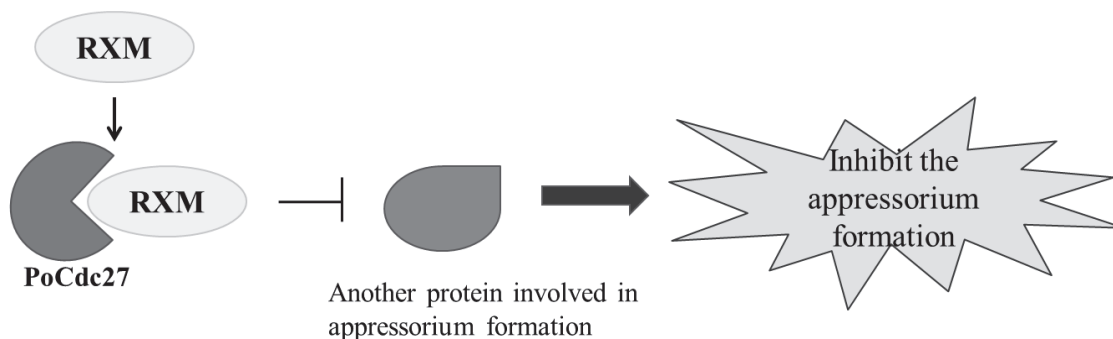


Fig. 16 A working model how RXM affects to *P. oryzae*.

RXM may bind to PoCdc27 and affects to other target(s) which have important function for appressorium formation and the ability to infection of *P. oryzae*.

総括

薬剤の未知作用点の解明は、薬の作用機序や病気メカニズム解明に重要であると共に新たな薬剤開発において近年重要視されてきている。作用点を解明できれば既存の薬剤の構造展開だけでなく、効率よくドラッグデザインを行うことができ、新たな治療薬や農薬等の開発へ応用しやすくなる。しかし、薬剤の中には作用点が何十年も解析が進んでいないものも多い。そこで、本研究では真菌であるイネいもち病菌を用いた解析により薬剤の真核生物における作用点探索を目的とした。

第一章では、イネいもち病菌の生育に影響を与えず、付着器分化を阻害する薬剤を探索することで、毒として強い作用を持つのではなく、真核生物に対して何らかの有用な作用を持つ可能性のある薬剤を選抜した。その結果 Chloramphenicol、Rifampicin、Aspirin、マクロライド系抗生物質について既知の作用点以外の作用点の存在が示唆された。本研究ではマクロライド系抗生物質の RXM に注目したが、今後他の薬剤についても解析することで新たな知見を得られる可能性がある。

RXM の作用点解析にイネいもち病菌のゲノム DNA ライブラリーを使用した T7 フェージディスプレイ法を用いた。イネいもち病菌は遺伝子数に対しゲノムサイズが小さいため、イントロンが少なくゲノムの約 50% が翻訳領域であることからゲノムライブラリーを cDNA ライブラリーの代わりとして利用できた。ゲノムライブラリーを使用することでライブラリー中に遺伝子の偏りが無いという利点があり、今回標的として得られた *PoCDC27* は発現特異性があったことからゲノムライブラリーを用いたことは有用であったと考えられる。また、T7 フェージディスプレイ法を低分子化合物の標的タンパク質探索に用いた例は少ないが、今回 RXM の標的と考えられる分子が見つかったことから、低分子化合物に対してもこの手法は有用であると考えられる。

2 章では 1 章で RXM の標的候補として注目した *PoCdc27* が標的であるかをいくつかの視点から調べた。その結果、RXM と *PoCdc27* が直接相互作用していることが示唆され、*PoCdc27* が RXM による付着器形成抑制作用に関与していることが示唆された。*pocdc27* ノックダウン株では RXM による付着器分化抑制が緩和され、*PoCDC27* 過剰発現株では RXM による付着器分化抑制に変化がなかったことなどから、RXM による付着器抑制作用には *PoCdc27* が必要である可能性が示唆された。また、表面プラズモン共鳴解析により RXM と *PoCdc27* の直接相互作用が見られ (Fig. 15)、RXM と *PoCdc27* が複合体を形成することが予想された。これらの結果から *PoCdc27* はイネいもち病菌における RXM の標的分子であり、RXM と結合することで付着器分化抑制に関与することが示唆された。しかし、イネいもち病菌において *PoCdc27* 単独で RXM と結合しているか、他の APC サブユニット等との複合体で RXM に結合するかについて解明することはできなかった。*PoCdc27* 単独で何らかの機能を持つことも否定できず、またイネいもち病菌における APC の構造も未解明であるため、今後解析を進めることで *PoCdc27* の機能やイネいもち病菌における APC の構造、

さらには付着器分化に対する新たな知見を得られると考えられる。

本研究により RXM はイネいもち病菌に対して付着器分化抑制作用と生育阻害作用の少なくとも2つの作用を持ち、この2つの作用点は異なっていることが示唆された。このうち生育阻害に関与する作用点は今回解明できなかった。しかし、RXM は原核生物のタンパク質合成を阻害すること、生育阻害は高濃度 RXM 添加でみられたことから、原核型リボソームであるミトコンドリアのリボソームが標的となっている可能性が考えられる (De Vries *et al.*, 1973)。実際ミトコンドリアに作用し、呼吸阻害を引起す rotenone は農薬として使用され、真核生物に対しても毒性を示すことが知られているなど呼吸阻害剤は真核生物に対し毒性を持つ (Nanda *et al.*, 2009)。RXM がミトコンドリアのリボソームに作用しているという証拠も現時点ではなく、他の標的が存在する可能性もある。また、イネいもち病菌の 80S リボソームに結合する可能性も否定できないが、ファージディスプレイ法による解析でリボソームサブユニットが標的候補として得られなかったことからイネいもち病菌のリボソームに作用する可能性は低いのではないかと予想される。今回 T7 により RXM の標的候補として得られた他の3つのタンパク質について今後さらに解析することで新たな標的を発見できる可能性も考えられる。

今回 PoCdc27 は RXM の標的分子である可能性が示唆され、その作用機序は PoCdc27 と RXM が複合体を形成し、付着器形成に関与する何らかの因子に作用すると考えられた。また、PoCDC27 のホモログとされる遺伝子がヒトにまで存在していることから、ヒトにおける RXM の副作用点も CDC27 である可能性も否定できず、Human CDC27 と RXM が複合体を形成し、他の因子に影響する可能性がある。今後、ヒトにおいても CDC27 が RXM の標的であるかさらなる解析を行うことでこれまで未解明であった抗炎症作用や抗癌作用といった作用機序の解明につながる可能性がある。作用機序が解明されれば、新薬開発への応用がより期待できる。また、RXM がイネいもち病菌の PoCdc27 特異的に結合する場合、標的に合わせてドラッグデザインを行うことでいもち病菌や真菌に対する選択性の高い薬剤への応用が可能となる可能性がある。

本研究で用いた手法は、イネいもち病菌の分化に影響を与える生理活性物質に広く応用可能であり、これまで解析困難であった副作用点のような結合が弱いものについても解析できると共に、今回解析した RXM のように薬剤がタンパク質の機能を阻害するものでない場合も作用点特定につながり得る。今後、様々な化合物に対し、網羅的に解析を進め、新たな薬効や未解明の作用点を解明することで、新薬開発への貢献が期待できる。

引用文献

Ahn N, Kim S, Choi W, Im KH, Lee YH. 2004. Extracellular matrix protein gene, EMP1, is required for appressorium formation and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells* **17**(1): 166-173.

Amborabé BE, Fleurat-Lessard P, Chollet JF, Roblin G. 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure–activity relationship. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**(12): 1051-1060.

Amsden G. 2005. Anti-inflammatory effects of macrolides—an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**(1): 10-21.

Aoki D, Ueno S, Kubo F, Oyama T, Sakuta T, Matsushita K, Maruyama I, Aikou T. 2005. Roxithromycin inhibits angiogenesis of human hepatoma cells in vivo by suppressing VEGF production. *Anticancer Research* **25**(1A): 133-138.

Arai M, Haneishi T, Kitahara N, Enokita R, Kawakubo K. 1976. Herbicidins A and B, two new antibiotics with herbicidal activity. I. Producing organism and biological activities. *The Journal of Antibiotics* **29**(9): 863-869.

Araki Y, Sugihara M, Sawada H, Fujimoto H, Masuko M. 2005. Monitoring of the sensitivity of *Magnaporthe grisea* to Metominostrobin 2001-2003: no emergence of resistant strains and no mutations at codon 143 or 129 of the cytochrome b gene. *Journal of Pesticide Science* **30**(3): 203-208.

Arie T, Kaneko I, Yoshida T, Noguchi M, Nomura Y, Yamaguchi I. 2000. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**(12): 1330-1339.

Ashburn TT, Thor KB. 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**(8): 673-683.

Blilou I, Frugier F, Folmer S, Serralbo O, Willemsen V, Wolkenfelt H, Eloy NB, Ferreira PC, Weisbeek P, Scheres B. 2002. The Arabidopsis HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes & Development* **16**(19):

2566-2575.

Brodersen DE, Clemons Jr WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**(7): 1143-1154.

Bryskier A. 1998. Roxithromycin: review of its antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**(suppl 2): 1-21.

Chaffin WL. 1985. Effect of tunicamycin on germ tube and yeast bud formation in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* **131**(8): 1853-1861.

Chang X-b, Stewart AK. 2011. What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon? *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2**(3): 287.

Chen J, Zheng W, Zheng S, Zhang D, Sang W, Chen X, Li G, Lu G, Wang Z. 2008. Rac1 is required for pathogenicity and Chm1-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *PLoS Pathogens* **4**(11): e1000202.

Chou H, Glory A, Bachewich C. 2011. Orthologues of the anaphase-promoting complex/cyclosome coactivators Cdc20p and Cdh1p are important for mitotic progression and morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **10**(5): 696-709.

Cohen P. 2002. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* **1**(4): 309-315.

Cohen T, Creger WP. 1967. Acute myeloid leukemia following seven years of aplastic anemia induced by chloramphenicol. *The American Journal of Medicine* **43**(5): 762-770.

Danaher M, Howells LC, Crooks SR, Cerkvenik-Flajs V, O’Keeffe M. 2006. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B* **844**(2): 175-203.

De Vries H, Arendzen A, Kroon A. 1973. The interference of the macrolide antibiotics with mitochondrial protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* **331**(2): 264-275.

Dean RA. 1997. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **35**(1): 211-234.

Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**(7036): 980-986.

DeZwaan TM, Carroll AM, Valent B, Sweigard JA. 1999. *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *The Plant Cell Online* **11**(10): 2013-2030.

Endo A, Kakiki K, Misato T. 1970. Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *Journal of Bacteriology* **104**(1): 189-196.

Fischer G, Tradler T, Zarnt T. 1998. The mode of action of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases in vivo: binding vs. catalysis. *FEBS Letters* **426**(1): 17-20.

Flisiak R, Horban A, Gallay P, Bobardt M, Selvarajah S, Wiercinska - Drapalo A, Siwak E, Cielniak I, Higersberger J, Kierkus J. 2008. The cyclophilin inhibitor Debio - 025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus. *Hepatology* **47**(3): 817-826.

Gao X, Ray R, Xiao Y, Barker PE, Ray P. 2007. Inhibition of sulfur mustard-induced cytotoxicity and inflammation by the macrolide antibiotic roxithromycin in human respiratory epithelial cells. *BMC Cell Biology* **8**(1): 17.

Geick A, Eichelbaum M, Burk O. 2001. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *Journal of Biological Chemistry* **276**(18): 14581-14587.

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**(6896): 387-391.

Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer H-P, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. 1999. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *Journal of Clinical Investigation* **104**(2): 147-153.

Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG, Valent B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science* **239**(4837): 288-290.

Hartwell LH, Mortimer RK, Culotti J, Culotti M. 1973. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* **74**(2): 267-286.

Heye U, Speich J, Siegle H, Steinemann A, Forster B, Knauf-Beiter G, Herzog J, Hubele A. 1994. CGA 219417: a novel broad-spectrum fungicide. *Crop Protection* **13**(7): 541-549.

Hidesuke F, Pei-Ming L, Chii Y, Yuko M, Satoshi M, Yoshimasa U. 1991. Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* **42**(9): 1661-1671.

Hodgman MJ, Garrard AR. 2012. A review of acetaminophen poisoning. *Critical Care Clinics* **28**(4): 499-516.

Honore N, Cole ST. 1994. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**(2): 238-242.

Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP. 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**(24): 11281-11284.

Hwang BK, Ahn SJ, Moon SS. 1994. Production, purification, and antifungal activity of the antibiotic nucleoside, tubercidin, produced by *Streptomyces violaceoniger*. *Canadian Journal of Botany* **72**(4): 480-485.

Inoue K, Onoe T, Park P, Ikeda K. 2011. Enzymatic detachment of spore germlings in *Magnaporthe oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* **323**(1): 13-19.

Ishizaki K, Hoshi T, Abe S, Sasaki Y, Kobayashi K, Kasaneyama H, Matsui T, Azuma S. 2005. Breeding of blast resistant isogenic lines in rice variety “Koshihikari” and evaluation of their characters. *Breeding Science* **55**(3): 371-377.

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. 1999. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature Medicine* **5**(12): 1418-1423.

Kaczka EA, Gitterman CO, Dulaney EL, Folkers K. 1962. Hadacidin, a new growth-inhibitory substance in human tumor systems. *Biochemistry* **1**(2): 340-343.

- Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, Takeuchi N, Kohyama T, Nakamura H, Kasama T, Kobayashi K, Nakahara K, Morita Y.** 1998. Roxithromycin inhibits cytokine production by and neutrophil attachment to human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**(6): 1499-1502.
- Kesti T, Flick K, Keränen S, Syväoja JE, Wittenberg C.** 1999. DNA polymerase ϵ catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. *Molecular Cell* **3**(5): 679-685.
- Kimura M, Izawa K, Yoneyama K, Arie T, Kamakura T, Yamaguchi I.** 1995. A novel transformation system for *Pyricularia oryzae*: adhesion of regenerating fungal protoplasts to collagen-coated dishes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **59**(6): 1177-1180.
- Kimura M, Kamakura T, Tao QZ, Kaneko I, Yamaguchi I.** 1994. Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Molecular and General Genetics MGG* **242**(2): 121-129.
- Kohyama T, Takizawa H, Kawasaki S, Akiyama N, Sato M, Ito K.** 1999. Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(4): 907-911.
- Kramer KM, Fesquet D, Johnson AL, Johnston LH.** 1998. Budding yeast RSI1/APC2, a novel gene necessary for initiation of anaphase, encodes an APC subunit. *The EMBO Journal* **17**(2): 498-506.
- Krappmann S.** 2007. Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *Fungal Biology Reviews* **21**(1): 25-29.
- Lamb J, Michaud W, Sikorski R, Hieter P.** 1994. Cdc16p, Cdc23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *The EMBO Journal* **13**(18): 4321.
- Lee S, Jia Y, Jia M, Gealy DR, Olsen KM, Caicedo AL.** 2011. Molecular evolution of the rice blast resistance gene Pi-ta in invasive weedy rice in the USA. *PLoS One* **6**(10): e26260.
- Leung H, Borromeo ES, Bernardo MA, Notteghem JL.** 1988. Genetic analysis of virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* **78**(9): 1227-1233.

- Liu J, Farmer Jr JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL.** 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**(4): 807-815.
- Liu Y-G, Whittier RF.** 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**(3): 674-681.
- Manchado E, Eguren M, Malumbres M.** 2010. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and-independent functions. *Biochemical Society Transactions* **38**(1): 65.
- McCafferty HR, Talbot NJ.** 1998. Identification of three ubiquitin genes of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, one of which is highly expressed during initial stages of plant colonisation. *Current Genetics* **33**(5): 352-361.
- Min JY, Jang YJ.** 2012. Macrolide therapy in respiratory viral infections. *Mediators of inflammation* **2012**
- Miura I, Kamakura T, Maeno S, Hayashi S, Yamaguchi I.** 1994. Inhibition of enzyme secretion in plant pathogens by mepanipyrim, a novel fungicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48**(3): 222-228.
- Morgan S, Grootendorst P, Lexchin J, Cunningham C, Greyson D.** 2011. The cost of drug development: a systematic review. *Health Policy* **100**(1): 4-17.
- Morimura T, Noda N, Kato Y, Watanabe T, Saitoh T, Yamazaki T, Takada K, Aoki S, Ohta K, Ohshige M.** 2006. Identification of antibiotic clarithromycin binding peptide displayed by T7 phage particles. *The Journal of Antibiotics* **59**(10): 625-632.
- Nanda NB, Das PC, Jena J.** 2009. Use of rotenone as piscicide: toxicity levels in a few common freshwater predatory and weed fishes. *Journal of Applied Aquaculture* **21**(4): 241-249.
- Neumann G, Winter E, Pittis J.** 1992. Pyrimethanil: a new fungicide. *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases-1992. Volume 1*: 395-402.
- O'Donnell K, Osmani A, Osmani S, Morris N.** 1991. bimA encodes a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins and is required for the completion of mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science* **99**(4): 711-719.

Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* **246**(1): 174-181.

Ogawa N, Sugawara Y, Fujiwara Y, Noma T. 2003. Roxithromycin promotes lymphocyte apoptosis in *Dermatophagoides*-sensitive asthma patients. *European Journal of Pharmacology* **474**(2): 273-281.

Ohnuki S, Oka S, Nogami S, Ohya Y. 2010. High-content, image-based screening for drug targets in yeast. *PLoS One* **5**(4): e10177.

Omura S, Tsuzuki K, Sunazuka T, Marui S, Toyoda H, Inatomi N, Itoh Z. 1987. Macrolides with gastrointestinal motor stimulating activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **30**(11): 1941-1943.

Ozeki M, Miyamoto N, Hashiba M, Baba S. 1995. Inhibitory effect of roxithromycin on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta oto-laryngologica. Supplementum* **525**: 61-63.

Passmore L. 2004. The anaphase-promoting complex (APC): the sum of its parts? *Biochemical Society Transactions* **32**(5): 724-727.

Pestka S. 1971. Inhibitors of ribosome functions. *Annual Reviews in Microbiology* **25**(1): 487-562.

Peters JM. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**(9): 644-656.

Philips FS, Schwartz HS, Sternberg SS, Tan CT. 1960. THE TOXICITY OF ACTINOMYCIN D*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **89**(2): 348-360.

Pioletti M, Schlünzen F, Harms J, Zarivach R, Glühmann M, Avila H, Bashan A, Bartels H, Auerbach T, Jacobi C. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *The EMBO Journal* **20**(8): 1829-1839.

Reich E, Franklin R, Shatkin A, Tatum E. 1962. ACTION OF ACTINOMYCIN DON ANIMAL CELLS AND VIRUSE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48**(7): 1238.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York.

Sarkar S, Thach RE. 1968. Inhibition of formylmethionyl-transfer RNA binding to ribosomes by tetracycline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **60**(4): 1479.

Saunders DG, Aves SJ, Talbot NJ. 2010a. Cell Cycle–Mediated Regulation of Plant Infection by the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell Online* **22**(2): 497-507.

Saunders DG, Dagdas YF, Talbot NJ. 2010b. Spatial uncoupling of mitosis and cytokinesis during appressorium-mediated plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell Online* **22**(7): 2417-2428.

Scaglione F, Rossoni G. 1998. Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **41**(suppl 2): 47-50.

Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**(6858): 814-821.

Serralbo O, Pérez-Pérez JM, Heidstra R, Scheres B. 2006. Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an Arabidopsis CDC27 homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(35): 13250-13255.

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M. 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* **341**(21): 1565-1571.

Smith GP, Petrenko VA. 1997. Phage display. *Chemical Reviews* **97**(2): 391-410.

Smith J, Willis AL. 1971. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature* **231**(25): 235-237.

Staben C, Jensen B, Singer M, Pollock J, Schechtman M, Kinsey J, Selker E. 1989. Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genet. Newsl* **36**: 79-81.

Stark LA, Din FV, Zwacka RM, Dunlop MG. 2001. Aspirin-induced activation of the NF- κ B signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *The FASEB Journal* **15**(7): 1273-1275.

Steiner S, Witzmann FA. 2000. Proteomics: applications and opportunities in preclinical drug development. *Electrophoresis* **21**(11): 2099-2104.

Suzaki H, Asano K, Ohki S, Kanai K, Mizutani T, Hisamitsu T. 1999. Suppressive activity of a macrolide antibiotic, roxithromycin, on pro-inflammatory cytokine production in vitro and in vivo. *Mediators of Inflammation* **8**(4-5): 199-204.

Takatsuki A, Arima K, Tamura G. 1971. Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *The Journal of Antibiotics* **24**(4): 215.

Thornwell SJ, Peery RB, Skatrud PL. 1995. Cloning and characterization of the gene encoding translation elongation factor 1 α from *Aureobasidium Pullulans*. *Gene* **162**(1): 105-110.

Thornton BR, Ng TM, Matyskiela ME, Carroll CW, Morgan DO, Toczyski DP. 2006. An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes & development* **20**(4): 449-460.

Topper LM, Campbell MS, Tugendreich S, Duam J, Burke DJ, Hieter P, Gorbsky GJ. 2002. The dephosphorylated form of the anaphase-promoting complex protein Cdc27/Apc3 concentrates on kinetochores and chromosome arms in mitosis. *Cell Cycle-Landes Bioscience-* **1**(4): 282-292.

Tugendreich S, Boguski MS, Seldin MS, Hieter P. 1993. Linking yeast genetics to mammalian genomes: identification and mapping of the human homolog of CDC27 via the expressed sequence tag (EST) data base. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**(21): 10031-10035.

Ueno S, Aoki D, Kubo F, Hiwatashi K, Matsushita K, Oyama T, Maruyama I, Aikou T. 2005. Roxithromycin inhibits constitutive activation of nuclear factor κ B by diminishing oxidative stress in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* **11**(15): 5645-5650.

Vodermaier HC, Gieffers C, Maurer-Stroh S, Eisenhaber F, Peters JM. 2003. TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Current Biology* **13**(17): 1459-1468.

Watanabe S, Kumakura K, Izawa N, Nagayama K, Mitachi T, Kanamori M, Teraoka T, Arie T. 2007. Mode of action of Trichoderma asperellum SKT-1, a biocontrol agent against Gibberella fujikuroi. *Journal of Pesticide Science* **32**(3): 222-228.

Weisblum B, Davies J. 1968. Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriological Reviews* **32**(4 Pt 2): 493.

Wilson RA, Talbot NJ. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* **7**(3): 185-195.

Xiao J, Ohshima A, Kamakura T, Ishiyama T, Yamaguchi I. 1994. Extracellular Glycoprotein (s) Associated with Cellular Differentiation in *Magnaporthe grisea*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* **7**(5): 639-644.

Xiao JZ, Watanabe T, Sekido S, Choi WB, Kamakura T, Yamaguchi I. 1997. An anti-hydrotactic response and solid surface recognition of germ tubes of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**(7): 1225-1229.

Yamada H, Kumada K, Yanagida M. 1997. Distinct subunit functions and cell cycle regulated phosphorylation of 20S APC/cyclosome required for anaphase in fission yeast. *Journal of Cell Science* **110**(15): 1793-1804.

Yatsunami J, Fukuno Y, Nagata M, Tsuruta N, Aoki S, Tominaga M, Kawashima M, Taniguchi S, Hayashi S. 1999. Roxithromycin and clarithromycin, 14-membered ring macrolides, potentiate the antitumor activity of cytotoxic agents against mouse B16 melanoma cells. *Cancer Letters* **147**(1): 17-24.

Yoon HJ, Feoktistova A, Wolfe BA, Jennings JL, Link AJ, Gould KL. 2002. Proteomics analysis identifies new components of the fission and budding yeast anaphase-promoting complexes. *Current Biology* **12**(23): 2048-2054.

Young RA, Gonzalez JP, Sorkin EM. 1989. Roxithromycin. *Drugs* **37**(1): 8-41.

Yu H. 2002. Regulation of APC–Cdc20 by the spindle checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* **14**(6): 706-714.

Zachariae W, Shin TH, Galova M, Obermaier B, Nasmyth K. 1996. Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **274**(5290): 1201-1204.

Zhang L, Fujita T, Wu G, Xiao X, Wan Y. 2011. Phosphorylation of the anaphase-promoting complex/Cdc27 is involved in TGF- β signaling. *Journal of Biological Chemistry* **286**(12): 10041-10050.

Zhang S, Letham DD, Jagendorf AT. 1993. Inhibition of thylakoid ATPase by venturicidin as an indicator of CF1-CF0 interaction. *Plant Physiology* **101**(1): 127-133.

Zhang Y. 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**: 529-564.

Čulić O, Eraković V, Parnham MJ. 2001. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *European Journal of Pharmacology* **429**(1): 209-229.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始暖かくご指導くださいました東京理科大学 理工学部 応用生物科学科 鎌倉高志教授に心からお礼申し上げます。普段の研究や論文作成にご助力いただきました東京理科大学鎌倉研究室の成川恵先生に厚く御礼申し上げます。

化合物の合成や表面プラズモン共鳴解析でご指導賜りました、東京理科大学菅原研究室の紙透伸治先生、イサグウイレ ヘスス氏、ゲノム創薬センターの皆様に厚く御礼申し上げます。

京都府立大学の倉持 幸司准教授には Bio-RXM の合成でご助力いただきました。心からお礼申し上げます。

名古屋大学大学院生命農学研究科の中嶋佑一氏にはファージディスプレイ法に用いましたベクターを作成していただき、論文作成の際にもご助言をいただきました。心からお礼申し上げます。

また、これまでこの研究に関わった、長島由夏氏、等々力慎也氏、各務佑哉氏、小泉優希氏、熊坂茉佑氏、現在共同で実験を進めてくれている草間瞬太氏に厚く御礼申し上げます。

共に研究生活を過伍してきた諸先輩方、当研究室の皆様に御礼申し上げます。

本論文を御審査して頂きました東京理科大学理工学部の松永幸大教授、菅原二三男教授、東京理科大学基礎工学部の島田浩章教授、東京理科大学薬学部の早川洋一教授に感謝申し上げます。

最後になりましたが、博士課程への進学、その間の生活を支えて頂き、また様々な御支援、御激励を賜りました両親に心より感謝と御礼を申し上げます。

平成 27 年 1 月 23 日

石井 晶