

ウリ類炭疽病菌における
ホメオボックス転写制御因子の機能解析

2019 年

滋賀県立大学大学院 環境科学研究科
環境動態学専攻 生物生産研究部門
1556005 平岩（横山） 綾

目 次	頁
第1章 緒言	1
第2章 材料および方法	6
1) 供試菌株および培養条件	
2) ホメオボックス転写因子の同定	
3) <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊ベクターの構築	
4) プロトプラスト-PEG 法による <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊株の作出	
5) <i>CoHox1</i> 遺伝子相補ベクターの構築と <i>CoHox1</i> 遺伝子相補株の作出	7
6) <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊株の特徴づけ	8
6-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較	
6-2) 宿主葉への病原性の観察	
6-3) ガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化の観察	9
6-4) 宿主葉内での形態分化の観察	
6-5) <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 <i>CoGAS1</i> の発現	10
6-6) 熱処理した宿主葉への病原性の観察	
6-7) 蛍光タンパク質 eGFP を用いた長期培養時の宿主内での生存	11
6-8) 分離法を用いた長期培養時の宿主内での生存	
7) <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊ベクターの構築と <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊株の作出	12
8) <i>CoHox3</i> 遺伝子相補ベクターの構築と <i>CoHox3</i> 遺伝子相補株の作出	
9) <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊株の特徴づけ	13
9-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較	
9-2) 宿主葉への病原性の観察	
9-3) ガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化の観察	
9-4) 宿主葉上での形態分化の観察	14
9-5) <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 <i>CoGAS1</i> の発現	
9-6) 孢子発芽時の核分裂の観察	
第3章 結果	16
1) <i>C. orbiculare</i> のホメオボックス遺伝子の同定	

2) CoHox1 の解析	
2-1) <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊株および相補株の作出	
2-2) <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊株の特徴づけ	17
2-2-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較	
2-2-2) 宿主葉への病原性の観察	
2-2-3) ガラスおよび人工セルローズ膜上での形態分化の観察	18
2-2-4) <i>CoHox1</i> 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 <i>CoGAS1</i> の発現	
2-2-5) 宿主葉内での侵入菌糸の観察	19
2-2-6) 熱処理した宿主葉への病原性の観察	
2-2-7) 蛍光タンパク質 eGFP を用いた長期培養時の宿主内での生存	20
2-2-8) 分離法を用いた長期培養時の宿主内での生存	
3) CoHox3 の解析	
3-1) <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊株の作出	
3-2) <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊株の特徴づけ	21
3-2-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較	
3-2-2) 宿主葉への病原性の観察	
3-2-3) ガラスおよび人工セルローズ膜上での形態分化の観察	22
3-2-4) 宿主葉内での侵入菌糸の観察	23
3-2-5) <i>CoHox3</i> 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 <i>CoGAS1</i> の発現	
3-2-6) 孢子発芽時の核分裂の観察	
第4章 考察	25
摘要	30
引用文献	31
謝辞	37
図表	38

第1章 緒言

Colletotrichum orbiculare はウリ科植物に炭疽病を引き起こす病原菌である。*C. orbiculare* を含む多くの植物病原糸状菌は、宿主植物への感染のために、付着器と呼ばれる構造を形成する。*C. orbiculare* の宿主植物への感染行動は分生子が宿主表面上に付着することから始まる。付着した分生子は発芽し、発芽管の先端に暗褐色にメラニン化したドーム状の付着器を形成させる。付着器が成熟した後、貫穿糸と呼ばれる構造が形成され、宿主植物内に貫入、侵入菌糸が伸展することで感染が成立する (Kubo and Takano 2013)。*Colletotrichum* 属において、宿主侵入初期のバイオトロフィック状態の菌糸は生きた宿主の細胞内で発達し、その後、侵入菌糸がネクロトロフィック状態に移行して感染を成立させる (Huser et al. 2009 ; O' Connell et al. 2012)。*C. orbiculare* の野生株 104-T 株は既に全ゲノム解析が終了しており (Gan et al. 2013)、ヘミバイオトロフィックな感染についての研究のモデル菌として用いられている。

C. orbiculare を始め、多くの植物病原菌において、感染メカニズムのために病原性関連遺伝子の研究が盛んに行われている。病原性関連遺伝子の探索のための方法はいくつかあり、実際に行われている。1 つは、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* などのすでに遺伝子解析が進んでいるモデル生物や他の植物病原菌から病原性関連遺伝子と推定される遺伝子を選択し、解析したい植物病原菌のホモログについて調査する方法である。*C. orbiculare* での例としては、MAP キナーゼ遺伝子 *CMK1* が挙げられる (Takano et al. 2000)。*S. cerevisiae* において、MAP キナーゼ遺伝子を含む MAP キナーゼカスケードは交配、グリセロール合成および細胞壁生合成に関与することが知られている。イネもち病菌 *Magnaporthe oryzae* においては、MAP キナーゼ遺伝子として *Pmk1* と *Mps1* の 2 つがある。*M. oryzae* の *Pmk1* は交配応答に必須である酵母の *Fus3* のホモログであるが、交配には関与しなかった (Xu and Humer 1990)。しかし、*M. oryzae* の *Pmk1* は宿主植物への感染に必須である付着器形成と宿主植物への侵入生育に関与していた。また、酵母の *Slit2* のホモログであるもう 1 つの *M. oryzae* の MAP キナーゼ *Mps1* は宿主植物への侵入に関与した (Xu et al. 1998)。これらの結果は、MAP キナーゼが異なる生物で機能的に保存されているが、その役割は異なることが示唆された。そこで、*M. oryzae* の MAP キナーゼ遺伝子 *PMK1* のホモログである *C. orbiculare* の *CMK1* について、遺伝子破壊株を作出し、*M. oryzae* と同様に付着器形成および侵入生育に関与するか、また、他の機能を有しているかについて調査された (Takano et al. 2000)。その結果、*C. orbiculare* の *CMK1* は付着器形

成だけではなく、*M. oryzae*のPMK1にはなかった分生胞子の発芽への関与も認められた。よって、MAP キナーゼ遺伝子は多くの生物が有しているが、その機能は異なることがわかった。この様に、既知の糸状菌にとって重要な遺伝子を調査することにより、病原性関連遺伝子の情報を得ることができる。

病原性関連遺伝子の探索のためのもう 1 つの方法は、調査する植物病原菌の遺伝子をランダムに突然変異させ、病原性が低下した菌株をスクリーニングし、病原性低下もしくは欠損株の変異遺伝子を同定する方法である。マーカー遺伝子を用いたランダム導入突然変異法の 1 つには、Restriction enzyme-mediated integration (REMI) 法がある (Schiestl and Petes 1991)。これは植物病原菌の研究に長い間用いられてきた。*C. orbiculare*においても、病原性関連遺伝子の探索のために用いられており、これまでに、ペルオキシソームにおける脂肪酸のβ酸化に関与し、病原性に重要な ClaPEX6 などが得られている (Kimura et al. 2001)。また、遺伝子導入法は REMI 法以外にも、*Agrobacterium tumefaciens* を用いた手法がある。*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AtMT) 法は植物の形質転換法としてこれまで長い間使用されてきた。近年では、*A. tumefaciens* は植物だけではなく菌類においても遺伝子導入に用いられている。*C. orbiculare*においては、Tsuji et al. (2003a) にてランダム挿入突然変異のために AtMT 法が用いられている。ここでは、約 5,000 菌株の遺伝子変異株が得られ、メラニン生合成に変化が認められた菌株を 8 つ得ることができた。また、挿入された T-DNA をマーカーとした TAIL-PCR により、変異遺伝子の同定を行うこともできた。この結果は、これまで他の生物で注目されていなかった遺伝子や特定の生物のみに機能する遺伝子を得ることができる可能性を示している。

これまで、*C. orbiculare* の病原性関連遺伝子の探索のため、野生株 104-T 株を親株として AtMT 法を用いたランダム突然変異株を作出して Path-1 から Path-14 株と名付け、各菌株の変異遺伝子の同定を行ってきた (表 1、丸山 2011 ; 前田 2011 ; 小玉 2012 ; 横山 2013 ; 鈴木ら 2014 ; 丹羽 2016)。Path-1 株ではミトコンドリアでの脂肪酸のβ酸化に関与する酵素 Enoyl-CoA hydratase (Ech1) をコードする *CoEch1* 遺伝子が同定されたため、*CoEch1* 遺伝子破壊株を作出してその表現型を解析した (多々良 2013 ; 小松 2014 ; 水口 2017)。*CoEch1* 遺伝子破壊株の分生胞子を宿主植物へ接種した場合、胞子発芽は認められるものの、形成される付着器は野生株と比較して小さくメラニン着色が薄く、侵入菌糸の形成が認められなかった。また、*CoEch1* 遺伝子破壊株は無傷の宿主葉へは病斑形成できなかったが、有傷接種において病斑を形成した。よって、Ech1 は正常な付着器形成や宿主植物

への侵入に関与していることが示唆された。さらに、緑色蛍光タンパク質 eGFP を用いて CoEch1 の局在を観察したところ、CoEch1 はミトコンドリアに存在することがわかった。また、経時的に脂肪顆粒の消長を観察した結果、野生株とは異なり、*CoEch1* 遺伝子破壊株は脂肪顆粒が残存していた。よって、CoEch1 が脂質分解に関与していることが示唆された。病原性欠損変異株の Path-11 株では細胞内シグナル伝達に重要な cAMP の分解に関与する phosphodiesterase (Pde) をコードする *CoPdeL* 遺伝子が同定された。*CoPdeL* 遺伝子破壊株の表現型解析の結果、分生胞子の発芽や付着器形成の低下が認められた (谷口 2014)。また、*CoPdeL* 遺伝子破壊株は無傷の宿主葉では病斑を形成できなかったが、有傷接種では病斑形成が認められた。Pde には高親和性の PdeH も存在する。*CoPdeH* 遺伝子破壊株は表現型に変化が認められなかったものの、*CoPdeL CoPdeH* 二重破壊株では病原性の著しい低下が認められた。さらに、*CoPdeL* 遺伝子破壊株および *CoPdeL CoPdeH* 二重破壊株の細胞内 cAMP 濃度は野生株よりも有意に高かったことから、cAMP 濃度の適切な制御が病原性に関与することが示唆された。その他の病原性欠損変異株の Path-2 株では *S. cerevisiae* の染色体伝達に関与する *PAT1*、Path-5 株ではガラクトサンの加水分解に関与する secreted endo-beta-galactanase をコードする遺伝子、Path-8 株では C6 finger domain-containing protein をコードする遺伝子、Path-10 株では upf0136 domain protein をコードする遺伝子、Path-12 株では亜鉛輸送体 cation diffusion facilitator をコードする遺伝子、Path-13 株では ATP synthase delta subunit をコードする遺伝子、Path-14 株では hypothetical protein CGLO_14080 をコードする遺伝子が同定できている。一方、Path-4 株および Path-6 株では TAIL-PCR による同定ができず、Path-3 株と Path-7 株は機能未知の遺伝子が同定された。解析を行っていない同定遺伝子についても病原性に関与することが期待できるため、今後解析を行う必要がある。Path-9 株では、ホメオボックス転写因子をコードする遺伝子が同定された。Path-9 株は宿主葉上で病斑形成できなかったが、人工セルロース膜への侵入が確認された (横山 2013)。また、Path-9 株は傷をつけた宿主葉および熱処理した宿主葉上でも病斑を形成できなかったことから、宿主の抵抗性に関係なく宿主内への侵入および伸展に必要な能力を欠損されたことが示唆された。Path-9 株で同定されたホメオボックス遺伝子が *C. orbiculare* の推定病原性関連遺伝子であることから、遺伝子破壊株を作成して、その表現型を詳細に観察することで遺伝子の機能を解析することとした。

ホメオボックス転写因子は様々な生物の形態分化に重要な因子である。ホメオボックス

はキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のホメオティック遺伝子内の約 180 bp の配列から発見された (McGinnis et al. 1984 ; Scott and Weiner 1984 ; Burglin and Affolter 2015)。ホメオボックス遺伝子は昆虫だけではなく動物や植物、菌類などに保有されており、形態分化に重要な役割を持っている。しかし、ホメオボックスの植物病原菌における病原性との関連についてはあまり報告されていない。植物病原菌のホメオボックスとしては Ste12 が知られている (Hoi and Dumas 2010 ; Rispail and Di Pietro 2010)。Ste12 はいくつかの植物病原菌において、宿主植物への侵入に関与することが報告されている。*M. oryzae* は Ste12 ホモログである MST12 を有しており、付着器侵入および交配に関与していることがわかっている (Park et al. 2002)。Ste12 は *S. cerevisiae* で最初に発見され (Errede and Ammerer 1989)、交配および仮性菌糸の生育で機能することがわかった。*S. cerevisiae* Ste12 は MAPK Fus3 および Kss1 の下流で機能する。Ste12 は DNA 結合ドメインの 1 つであるホメオドメイン様モチーフ Ste (InterPro number IPR003120) を N 末端に有している。*M. oryzae* において、*mst12* 遺伝子破壊株は栄養生育、孢子形成、孢子発芽および付着器形成において野生株と同様であった。一方、*mst12* 遺伝子破壊株は宿主イネおよびオオムギ葉上で病斑形成できず、タマネギ表皮細胞への侵入能力を欠いていた。*C. orbiculare* において、*S. cerevisiae* Ste12 ホモログの CST1 もまた宿主葉への侵入に関与していた (Tsuji et al. 2003b)。*cst1* 遺伝子破壊株は宿主葉上および人工セルロース膜上での貫穿糸形成ができなかった。マメ科炭疽病菌 *C. lindemuthianum* において、酵母 Ste12 ホモログの CLSTE12 もまた病原性に関与していた (Hoi et al. 2007)。*CLSTE12* 遺伝子破壊株は宿主ダイズ葉上で野生株と同様に侵入孔を形成したが、感染能力を欠いていた。灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* において、*Bc-ste12* 遺伝子破壊株は病原性の低下を示した (Schamber et al. 2010)。宿主葉上において、*Bc-ste12* 遺伝子破壊株は奇形の付着器を形成し、わずかししか侵入しなかった。加えて、*Bc-ste12* 遺伝子破壊株は菌核形成を欠損した。以上から、植物病原菌において、Ste12 は進化的に高度に保存された遺伝子であり、宿主への侵入に重要な因子であることがわかる。

他のホメオボックス遺伝子においては、*M. oryzae* の MoHOX2 がある。*MoHox2* 遺伝子破壊株は孢子形成を欠損したが付着器形成および病原性は正常であった (Kim et al. 2009)。また、*Fusarium* 属菌の MoHOX2 ホモログである Htf1 もまた孢子形成および孢子形成に重要な役割を持つ phialide の形成に関与する (Zheng et al. 2012)。また、*M. oryzae* においては他のホメオボックスについても調査されている (Kim et al. 2009)。MoHOX3 およ

び MoHOX5 は単独で機能を有していなかったが、MoHOX1 は菌糸生育とメラニン着色に、MoHOX4 は孢子サイズに、MoHOX6 は菌糸生育に、MoHOX7 は付着器形成と宿主侵入に関与することが示唆された。また、*B. cinerea* においては、MoHOX1 ホモログの BcHOX8 が菌糸生育および病原性に関与することが示唆された (Antal et al., 2012)。

この論文では、*C. orbiculare* の病原性欠損変異株の 1 つである Path-9 株において変異が認められたホメオボックス遺伝子 *CoHox1* および他のホメオボックス遺伝子の 1 つである *CoHox3* について解析を行った (横山 2015; Yokoyama et al. 2018; Yokoyama et al. 2019) ので、それらについて記述する。また、得られた結果から、ホメオボックス転写因子の植物病原菌の病原性発現における役割や機能について考察する。

第2章 材料および方法

1) 供試菌株および培養条件

供試菌株として、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) 野生株 104-T 株および polyketide synthase (*PKSI*) 遺伝子破壊株を用いた。供試植物はキュウリ (*Cucumis sativus*, 鈴成四葉, Takii & Co., Ltd., Kyoto, Japan) を用いた。野生株および本研究にて作出した遺伝子破壊株は Potato dextrose agar (PDA) 培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 上で 24 °C 暗黒条件下にて培養した。

2) ホメオボックス転写因子の同定

ホメオボックスドメイン (InterPro number IPR001356 および IPR009057) および STE 様ドメイン (IPR003120) を含む *C. orbiculare* のホメオボックスタンパク質については InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いて同定した。

3) *CoHox1* 遺伝子破壊ベクターの構築

CoHox1 遺伝子破壊ベクターを構築するために、Fusion-PCR 法 (Izumitsu et al. 2009) を用いた。まず、*CoHox1* 遺伝子の 5' 側非翻訳領域をプライマー disp-*CoHox1*-LF および disp-*CoHox1*-LR と、PCR の鋳型として 104-T 株のゲノムを用いて増幅した (表 2)。また、3' 側非翻訳領域もプライマー disp-*CoHox1*-RF および disp-*CoHox1*-RR と、PCR の鋳型として 104-T 株のゲノムを用いて増幅した。次に、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPH*) をプライマー disp-*CoHox1*-HF および disp-*CoHox1*-HR と、PCR の鋳型として pCB1004 プラスミドを用いて増幅した。PCR 反応液の組成は Takara Ex Taq (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) のプロトコルに従い、PCR 反応のサイクル条件は 96 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 15 秒、56 °C 45 秒、72 °C 1 分 30 秒を 40 サイクルで行った。得られた 3 つの断片を結合するために、*CoHox1* 遺伝子の両端の断片を 30 μL ずつ、*HPH* 遺伝子の断片を 20 μL 混合し、これを鋳型として Fusion-PCR を行った。PCR 反応のサイクル条件は、96 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 15 秒、56 °C 45 秒、72 °C 4 分を 40 サイクルで行った。得られた PCR 産物を *CoHox1* 遺伝子破壊ベクターとして用いた。

4) プロトプラスト-PEG 法による *CoHox1* 遺伝子破壊株の作出

PDA 培地上で 7 日間培養した 104-T 株の分生胞子を Potato dextrose broth (PDB, Difco

Laboratories Inc., Franklin Lakes, USA) 培地に植菌し、125 rpm、24 °C で 3 日間振とう培養した。培養後、菌体を培地から取り出し、菌体の洗浄のために等張液 (0.7M KCl、10 mM CaCl₂) を入れて軽く振り、6000 rpm で 10 分間遠心し、沈殿した菌体を回収した。洗浄後、細胞壁分解酵素 (50 mg/mL グルカネックス等張液、10 mg/mL キタラーゼ等張液) を菌体と混合し、1 時間振とう処理を行った。細胞壁分解酵素と十分に反応させた後にろ過し、ろ液を 6000 rpm で 10 分遠心分離し、プロトプラストを回収した。回収したプロトプラストを等張液で洗浄後、STC Buffer (1.2M Sorbitol、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM CaCl₂) を加えてプロトプラストの濃度が 1 x 10⁷ 孢子/mL になるよう調整した。STC Buffer で濃度調整したプロトプラスト 100 μL に *CoHox1* 遺伝子破壊ベクターを 10 μL 加え、氷上で 10 分間静置した。静置後、40% PEG 溶液 (40% polyethylene glycol, 1.2 M Sorbitol, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 3% 0.2 N NaOH (w/v), 蒸留水で 100 mL までメスアップ) を 200 μL 加えて転倒混和し、さらに 200 μL 加えて転倒混和後、600 μL 加えて転倒混和し、常温で 20 分間静置した。静置後、プラスチックシャーレに水滴状に広げ、ハイグロマイシン 100 ppm を添加した再生培地 (1 g/L Tryptone, 1 g/L yeast extract, 342.3 g/L sucrose, 10 g/L Agar) を 10 mL 加えて混ぜ、24 °C 暗黒条件下で約 10 日間培養した。再生培地上で形成されたコロニーは爪楊枝で取り、ハイグロマイシン 100 ppm を添加した PDA 培地に植菌して 24 °C 暗黒条件で 7 日間培養した。

5) *CoHox1* 遺伝子相補ベクターの構築と *CoHox1* 遺伝子相補株の作出

CoHox1 遺伝子の相補ベクターを構築するために、まず、プライマー disp-*CoHox1*-LF および disp-*CoHox1*-RR と、PCR の鋳型として 104-T 株のゲノムを用いて *CoHox1* 遺伝子の全長を増幅させた (表 2)。PCR 反応液の組成は Takara PrimeSter GXL (Takara Bio) のプロトコルに従った。PCR 反応のサイクル条件は、98 °C 10 秒、55 °C 15 秒、68 °C 4 分を 30 サイクルで行った。次に、プラスミド pZNat1 を制限酵素 *EcoRV* (Takara Bio) で切断し、PCR で得られた断片を DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara Bio) を用いてライゲーションした。ライゲーション後、*E. coli* DH5α Competent Cells (Takara Bio) にライゲーションしたベクターを 5 μL 加え、氷上で 20 分間静置した。静置後、42 °C 温湯で 45 秒間ヒートショック処理を行い、直後に氷上で 2 分間静置した。その後、SOC 培地に加え、37 °C で 1 時間振とう培養を行った。培養した溶液をカナマイシン 100 ppm 添加した LB 培地にまんべんなく広げ、37 °C で 1 晩培養した。培養後、得られたコロニーは PCR を用いて

CoHox1 遺伝子の導入を確認した。PCR にはプライマーchk-*CoHox1*-INF および chk-*CoHox1*-INR を用い、PCR 反応液の組成は KOD Dash (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) のプロトコルに従った (表 2)。PCR 反応のサイクル条件は、95 °C 4 分を 1 サイクル、95 °C 30 秒、52 °C 5 秒、72 °C 1 分 30 秒を 30 サイクルで行った。選抜したコロニーからプラスミドを抽出 (NucleoSpin plasmid QuickPure, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Düren, Germany) し、このプラスミドを *CoHox1* 遺伝子相補ベクターとして用いた。104-T 株のプロトプラストと同様の方法を用いて、*CoHox1* 遺伝子破壊株 (Δ *CoHox1*-28) のプロトプラストを作成し、プロトプラスト-PEG 法を用いて *CoHox1* 遺伝子相補株を作出した。また、再生培地に添加した薬剤にはナオセオスリシン 100 ppm を用いた。

6) *CoHox1* 遺伝子破壊株の特徴づけ

6-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較

野生株 104-T 株、*CoHox1* 遺伝子破壊株、エクトピック株および *CoHox1* 相補株を PDA 培地に植菌し、24 °C 暗黒条件下にて 7 日間培養後、各菌株の菌そう直径を測定した。また、分生孢子形成数は、各菌株を PDA 培地に植菌し、24 °C 暗黒条件下で 7 日間培養後、各菌株のシャーレに滅菌水 5 mL を加えて筆で分生孢子を懸濁し、この懸濁液を用いて血球計算盤でカウントした。

6-2) 宿主葉への病原性の観察

宿主植物であるキュウリ子葉を用いて *CoHox1* 遺伝子破壊株の病原性を調査するために、無傷および有傷条件での病斑形成を観察した。無傷条件は破壊株の付着器が宿主植物組織に侵入できるかを調べるために設定した。また、有傷条件は破壊株が植物組織内での侵入菌糸形成能力を保持しているかを調べるために設定した。発芽約 7 日後のキュウリ子葉を切り取り、湿らせたキムタオルを敷いたプラスチックケース内に静置した。各菌株を PDA 培地で 7 日間培養したのち、菌そうから爪楊枝を用いて分生孢子を取り、滅菌水に懸濁して孢子懸濁液を調整した。無傷条件ではキュウリ子葉の左側に野生株 104-T 株の孢子懸濁液を 20 μ L ずつ点滴接種し、子葉の右側に *CoHox1* 遺伝子破壊株、エクトピック株もしくは *CoHox1* 相補株の孢子懸濁液を接種した。また、有傷条件ではキュウリ子葉の右側の孢子懸濁液を接種する部分に爪楊枝の先で軽く擦ることで傷をつけ、無傷条件と同様に各菌株の孢子懸濁液を 20 μ L ずつ点滴接種した。有傷条件では野生株、*CoHox1* 遺伝子破壊株、

CoHox1 相補株に加えて、有傷接種でのみ病斑形成するポジティブコントロールの *PKS1* 遺伝子破壊株と病斑を形成しないネガティブコントロールの滅菌水も接種した。また、子葉左側は傷をつけずに孢子懸濁液を接種した。接種後、24 °C 12 時間照明条件下で 7 日間培養し、病斑形成を観察した。

6-3) ガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化の観察

人工物理面上での各菌株の形態分化を観察するために、ガラス面上で分生孢子を培養して観察を行った。野生株 104-T 株、*CoHox1* 遺伝子破壊株、エクトピック株および *CoHox1* 相補株を PDA 培地で 7 日間培養したのち、菌そうから爪楊枝を用いて分生孢子を取り、滅菌水に懸濁して孢子懸濁液を調整した。各菌株の孢子懸濁液 (1×10^5 孢子/mL) をガラススライド上にて 24 °C 暗黒条件下で 24 時間培養した。光学顕微鏡を用いて、各菌株の発芽孢子数および付着器形成数をカウントし、付着器形成率を算出した。各菌株について少なくとも 100 個以上の分生孢子的観察を 6 反復行った。有意差は Tukey-Kramer 法を用いて算出した。

また、植物細胞壁のモデル系である人工セルロース膜（透析用セロハンチューブ M-5、Kenis Ltd., Osaka, Japan）上で各菌株の形態分化を観察した。ガラス表面上での形態分化と同様に各菌株の孢子懸濁液を調整した。直径 30 mm のガラスシャーレにセルロース膜を適当な大きさに切り入れ、各菌株の孢子懸濁液を 1 mL 滴下して 24 °C で 48 時間培養した。培養後、セルロース膜をセルロース染色液（滅菌水 100 mL に対して 50 g ZnCl₂、20 g KI および 0.5 g I₂ を溶かした水溶液）で染色した（Suzuki et al. 1982）。セルロース膜上の各菌株の発芽孢子数、付着器形成数、侵入菌糸形成数を光学顕微鏡で測定し、付着器形成率および侵入菌糸形成率を算出した。各菌株について少なくとも 100 個以上の分生孢子的観察を 6 反復行った。有意差は Tukey-Kramer 法を用いて算出した。

6-4) 宿主葉内での形態分化の観察

CoHox1 遺伝子破壊株の病原性欠損の原因を調査するため、宿主葉上での形態分化を観察した。切り取ったキュウリ子葉の葉裏にガラス面上での形態分化観察と同様の方法で調整した各菌株の孢子懸濁液を 20 μL ずつ点滴接種し、湿室条件にしたプラスチックケース内にて 24 °C 12 時間日長条件下で培養した。培養 48、60、72、84 時間後に子葉表皮の接種部分をピンセットで剥ぎ取ってガラススライドに乗せ、各菌株の形態分化を光学顕微鏡で

観察した。観察した侵入菌糸を、植物への貫入直後の初期の侵入菌糸 (Type 1)、1つの植物細胞内で伸長した侵入菌糸 (Type 2)、隣接した植物細胞に伸展した侵入菌糸 (Type 3) の3つに分類し、観察した付着器数を分母として各段階の侵入菌糸を百分率で算出した。各菌株について少なくとも100個以上の付着器の観察を2反復行った。

6-5) *CoHox1* 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* の発現

付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* (Xue et al. 2002) のプロモーターに eGFP 遺伝子を融合し、野生株 104-T 株と *CoHox1* 遺伝子破壊株に導入した。*CoGAS1*-promoter-eGFP ベクターを構築するために、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio USA) を用いた (Zhu et al. 2007)。*CoGAS1* プロモーター断片と eGFP 断片を増幅するために、それぞれプライマー-CoGAS1p-inf-F および CoGAS1p-inf-R と eGFP-F および eGFP-inf-R を用い (表 3)、酵素には Takara PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio) を用いた。*CoGAS1* プロモーターの増幅断片においてはナオセオスリシン耐性遺伝子 (*NAT*) カセットを含む *EcoRV* で消化したベクター pZNat1 (Izumitsu et al. 2009) の末端および eGFP 断片と 15-bp のオーバーラップを含むように構築し、eGFP 断片においては pZNat1 の末端と 15-bp のオーバーラップを含むように構築した。遺伝子断片の pZNat1 への導入のために、In-Fusion 反応および形質転換をプロトコルに従って行った。形質転換には *E. coli* DH5 α Competent Cells を用いた。構築した *CoGAS1*-promoter-eGFP ベクターをプロトプラスト-PEG 法を用いて野生株 104-T 株および *CoHox1* 遺伝子破壊株に導入した。野生株および *CoHox1* 遺伝子破壊株の *CoGAS1*-promoter-eGFP 導入株の孢子懸濁液をスライドグラス上で 24 °C 暗黒下で 24 時間培養し、蛍光顕微鏡 (BX51) にて蛍光ミラーユニット U-MNIBA3 を用いて eGFP 蛍光を観察した。

6-6) 熱処理した宿主葉への病原性の観察

CoHox1 遺伝子破壊株が宿主植物の抵抗性を打破する能力を保持しているかを調査するために、熱処理した植物に *CoHox1* 遺伝子破壊株を接種して破壊株の病原性が回復するかを観察した。キュウリ子葉を 25 °C もしくは 50 °C の温湯で 30 秒熱処理し、1 時間静置して葉表面を乾かした後、各菌株の孢子懸濁液をガラス面上での形態分化観察と同様の方法で調整し、子葉に 20 μ L ずつ接種して、24 °C 12 時間照明下で培養した (Tanaka et al. 2007)。培養 7 日後に各菌株の病斑形成を観察した。

6-7) 蛍光タンパク質 eGFP を用いた長期培養時の宿主内での生存

CoHox1 遺伝子破壊株の侵入菌糸が宿主内で生存しているかを調査するために、*CoHox1* 遺伝子破壊株に緑色蛍光タンパク質遺伝子 *eGFP* を導入した。Sumita et al. (2017) にて記載されているプラスミドから *GPD1* プロモーター-eGFP をプライマー-eGFP-F および eGFP-R (表 2) を用いて増幅し、*CoHox1* 遺伝子相補ベクターと同様に *EcoRV* で切断された pZNat1 にライゲーションした。作成したプラスミドを pZNAT1-GPDpro-eGFP と名付け、*CoHox1* 遺伝子相補株の作出と同様に、*CoHox1* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox1-28$) のプロトプラストに導入し、eGFP 恒常発現 *CoHox1* 遺伝子破壊株を作成した。長期培養を行うために、葉を切りとらずポット栽培の状態のキュウリ子葉の葉裏に *CoHox1* 遺伝子破壊株および eGFP 恒常発現 *CoHox1* 遺伝子破壊株の孢子懸濁液を接種し、湿室にて 24 °C 12 時間照明下で培養した。培養 19 日後に接種部位の子葉表皮をピンセットで剥ぎ取り、侵入菌糸の eGFP 蛍光を蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) にて蛍光ミラーユニット U-MNIBA3 (excitation 470–495 nm, dichroic 505 nm, emission 501–550 nm, Olympus) を用いて観察した。

6-8) 分離法を用いた長期培養時の宿主内での生存

CoHox1 遺伝子破壊株を長期の間、宿主葉上で培養した時の生存の有無を調査のため、培養後に宿主葉上から分離が行えるかを試験した。*CoHox1* 遺伝子破壊株、ポジティブコントロールの *CoHox1* 相補株およびネガティブコントロールの *CST1* 遺伝子破壊株の孢子懸濁液 (1.0×10^5 分生孢子/mL) を宿主キュウリ本葉へスプレー接種し、ポットの状態でプラスチックコンテナ内に入れてビニールシートで密閉することで 24 時間湿室状態にした。その後、ビニールシートを取り、25°C で培養した。培養後、コルクボーラーにて接種葉を打ち抜き、次亜塩素酸ナトリウム 10% で 1 分表面消毒し、滅菌水にて 30 秒洗浄を 2 回行って、薬剤添加した培地に置床して 1 週間後に菌そう生育の有無を観察した。薬剤は *CoHox1* 遺伝子破壊株および *CoHox1* 相補株にはハイグロマイシン (100ppm) を、*CST1* 遺伝子破壊株にはジェネティシン (100ppm) を用い、細菌類の抑制のために全ての菌株でストレプトマイシン (20ppm) を用いた。試験は各菌株とも培地に菌そうディスク 8 つを置床し、2 反復行った。

7) *CoHox3* 遺伝子破壊ベクターの構築と *CoHox3* 遺伝子破壊株の作出

CoHox3 遺伝子破壊ベクターを構築するために、*CoHox1* 遺伝子破壊ベクターの構築と同様に Fusion-PCR 法 (Izumitsu et al. 2009) を用いた。まず、*CoHox3* 遺伝子の 5' 側非翻訳領域をプライマー disp-*CoHox3*-LF および disp-*CoHox3*-LR と、PCR の鋳型として 104-T 株のゲノムを用いて増幅した (表 3)。また、3' 側非翻訳領域もプライマー disp-*CoHox3*-RF および disp-*CoHox3*-RR と、PCR の鋳型として 104-T 株のゲノムを用いて増幅した。次に、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*HPH*) をプライマー disp-*CoHox3*-HF および disp-*CoHox3*-HR と、PCR の鋳型として pCB1004 プラスミドを用いて増幅した。PCR 反応液の組成は Takara Ex Taq (TAKARA BIO INC., Japan) のプロトコルに従い、PCR 反応のサイクル条件は 96 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 15 秒、56 °C 45 秒、72 °C 1 分 30 秒を 40 サイクルで行った。得られた 3 つの断片を結合するために、*CoHox3* 遺伝子の両端の断片を 30 μ L ずつ、*HPH* 遺伝子の断片を 20 μ L 混合し、これを鋳型として Fusion-PCR を行った。PCR 反応のサイクル条件は、96 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 15 秒、56 °C 45 秒、72 °C 4 分を 40 サイクルで行った。得られた PCR 産物を *CoHox3* 遺伝子破壊ベクターとして用いた。*CoHox3* 遺伝子破壊株の作出は *CoHox1* 遺伝子破壊株と同様に 104-T 株のプロトプラストを作出し、プロトプラスト-PEG 法を用いて *CoHox3* 遺伝子破壊ベクターを導入した。ハイグロマイシンを添加した再生培地から得られたコロニーをハイグロマイシン添加 PDA 培地に植菌し、24 °C 暗黒条件で 7 日間培養した。

8) *CoHox3* 遺伝子相補ベクターの構築と *CoHox3* 遺伝子相補株の作出

CoHox3 遺伝子相補ベクターを構築するために、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio USA, Inc., Mountain View, USA) を用いた (Zhu et al. 2007)。プロモーターおよびターミネーターの非転写領域を含む *CoHox3* 遺伝子の 8.3-kb 断片をプライマー comp-*CoHox3*-F および comp-*CoHox3*-R と Takara PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて増幅させた (表 3)。増幅断片においてはナオセオスリシン耐性遺伝子 (*NAT*) カセットを含む *EcoRV* で消化したベクター pZNat1 (Izumitsu et al. 2009) の末端と 15-bp のオーバーラップを含むように構築した。遺伝子断片の pZNat1 への導入のために、In-Fusion 反応および形質転換をプロトコルに従って行った。形質転換には *E. coli* DH5 α Competent Cells を用いた。*CoHox3* 相補株を作出するために、構築した *CoHox3* 遺伝子相補ベクターをプロトプラスト-PEG 法により *CoHox3* 破壊株 (Δ *CoHox3*-5) のプロトプラ

ストに導入した。

9) *CoHox3* 遺伝子破壊株の特徴づけ

9-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較

野生株 104-T 株、*CoHox3* 遺伝子破壊株、エクトピック株および *CoHox3* 相補株を PDA 培地に植菌し、24 °C 暗黒条件下にて 7 日間培養後、各菌株の菌そう直径を測定した。また、分生孢子形成数は、各菌株を PDA 培地に植菌し、24 °C 暗黒条件下で 7 日間培養後、各菌株のシャーレに滅菌水 5 mL を加えて筆で分生孢子を懸濁し、この懸濁液を用いて血球計算盤でカウントした。

9-2) 宿主葉への病原性の観察

CoHox3 遺伝子破壊株の病原性を調査するために、キュウリ子葉を用いて病斑形成を観察した。切り取ったキュウリ子葉の左側に野生株 104-T 株の孢子懸濁液を 20 μ L ずつ点滴接種し、子葉の右側に *CoHox1* 遺伝子破壊株、エクトピック株もしくは *CoHox1* 相補株の孢子懸濁液を接種した。各菌株の孢子懸濁液の孢子濃度を低濃度 1×10^4 孢子/mL および高濃度 1×10^6 孢子/mL として設定した。培養 7 日後に形成された病斑を観察した。病斑形成率は子葉 1 枚に孢子懸濁液を 3 滴ずつ計 5 枚に滴下し、全ての孢子懸濁液滴下部分で病斑が形成された場合を 100% とし、2 反復行って算出した。

9-3) ガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化の観察

人工物理面上での各菌株の形態分化を観察するために、ガラス面上で分生孢子を培養して観察を行った。野生株 104-T 株、*CoHox3* 遺伝子破壊株、エクトピック株および *CoHox3* 相補株を PDA 培地で 7 日間培養したのち、菌そうから爪楊枝を用いて分生孢子を取り、滅菌水に懸濁して孢子懸濁液を調整した。各菌株の孢子懸濁液 (1×10^5 孢子/mL) をガラススライド上にて 24 °C 暗黒条件下で 24 時間培養した。光学顕微鏡を用いて、各菌株の分生孢子発芽や付着器形成を観察した。*CoHox3* 遺伝子破壊株の発芽孢子を 4 つのタイプに分けた; Type 1、薄いメラニン化を伴う付着器様構造を形成した発芽孢子; Type 2、薄いメラニン化を伴う付着器様構造および伸長した菌糸を形成した発芽孢子; Type 3、薄いメラニン化を伴う伸長した菌糸を形成した発芽孢子; Type 4、メラニン化を伴わない伸長した菌糸を形成した発芽孢子。各菌株について少なくとも 100 個以上の分生孢子的観察を 6 反復行っ

た。また、0.5 M スクロース溶液を用いて野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の胞子懸濁液を調製し、ガラススライド上で 24 °C 24 時間培養後に観察した。

また、植物細胞壁のモデル系である人工セルロース膜上で各菌株の形態分化を観察した。ガラス表面上での形態分化と同様に各菌株の胞子懸濁液を調整した。直径 30 mm のガラスシャーレにセルロース膜を適当な大きさに切り入れ、各菌株の胞子懸濁液を 1 mL 加えて 24 °C で 48 時間培養した。セルロース膜上の各菌株の分生胞子発芽、付着器形成、侵入菌糸を光学顕微鏡で観察し、侵入菌糸形成率を算出した。各菌株について少なくとも 100 個以上の分生胞子の観察を 3 反復行った。

9-4) 宿主葉上での形態分化の観察

宿主葉上での形態分化および宿主葉内での侵入菌糸形成について観察するために、切り取ったキュウリ子葉の葉裏に野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の胞子懸濁液 (1×10^5 胞子/mL) を 20 μ L ずつ接種し、24 °C 72 時間培養した。観察を容易にするために、宿主葉上の胞子および菌糸をラクトフェノールコットンブルーで染色した。子葉表皮の接種部分をピンセットで剥ぎ取ってガラススライドに乗せ、接種部分 1 か所につき発芽胞子数と侵入菌糸数をカウントして侵入菌糸形成率を算出した。観察は 3 反復行った。

9-5) *CoHox3* 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* の発現

付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* (Xue et al. 2002) のプロモーターに eGFP 遺伝子を融合し、野生株 104-T 株と *CoHox3* 遺伝子破壊株に導入した。導入および観察方法は材料および方法 6-5) の *CoHox1* 遺伝子破壊株と同様に行った。また、0.5 M スクロース溶液で培養した野生株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の *CoGAS1*-promoter-eGFP 導入株についても同様に観察を行った。

9-6) 胞子発芽時における核分裂の観察

付着器形成時の核分裂の挙動を調査するため、*B. cinerea* のヒストン *H2B* 遺伝子に赤色蛍光タンパク質遺伝子 *mCherry* を融合させ、野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株に導入した。pZBchH2B-mCherry ベクターを構築するために、まず、C 末端に mCherry をタグ付けして遺伝子発現を調査するための pZCtmCherryGen1 プラスミドを構築した。pZGen1 はそれぞれ pII99 プラスミド (Naniki et al. 2001) および pCB1004 プラスミド

(Carroll et al. 1994) から得られる *Aspergillus nidulans trpC* プロモーターを含むネオマイシンリン酸転移酵素 II 遺伝子 (*NPTII*) を pZErO2.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) に導入したプラスミドである。mCherry 断片については 5' 末端に 5 つのグリカンリンカーを含む *EcoRV* および *SwaI* サイトを含む配列を含むように、プライマー-CtmCherry-F および mCherry-R を用いて pHL85 プラスミド (Liu et al. 2009) から増幅した (表 3)。増幅断片を pZGen1 の *EcoRV* サイトにライゲーションし、ネイティブの *ScaI* サイトの隣に導入した断片の 5' 末端に *EcoRV* サイトがあるプラスミドを pZCtmCherryGen1 とした。次に、*B. cinerea* のヒストン *H2B* 遺伝子をプライマー-BchH2B-prom-F および BchH2B-mCherry-R を用いて野生株 HYOGO11 株から PCR により増幅し (表 3)、pZCtmCherryGen1 プラスミドの *SwaI* サイトにライゲーションしたものを pZBchH2B-mCherry ベクターとした。構築した pZBchH2B-mCherry ベクターをプロトプラスト-PEG 法を用いて野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株に導入した。野生株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の *H2B-mCherry* 導入株の孢子懸濁液をスライドグラス上で 24 °C 暗黒下で培養し、培養 0、4、6、8、10、12、24 時間ごとに蛍光顕微鏡 (BX51) にて蛍光ミラーユニット U-MWIY2 (excitation 545–580 nm, dichroic 600 nm, emission 610IF, Olympus) を用いて mCherry 蛍光を観察した。また、0.5 M スクロース溶液で培養した野生株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の *H2B-mCherry* 導入株についても同様に観察を行った。

第3章 結果

1) *C. orbiculare* のホメオボックス遺伝子の同定

推定病原性関連遺伝子の探索のために AtMT 法を用いて (Tsuji et al. 2003a)、*C. orbiculare* の野生株 104-T 株の形質転換株を約 2,000 菌株作出し、病原性欠損株を 14 菌株選抜した (丸山 2011; 前田 2011; 小玉 2012)。そのうちの 1 つである Path-9 株について、変異遺伝子を同定して *CoHox1* と名付けた。

C. orbiculare ゲノムにおいてホメオボックスドメイン (IPR001356 および IPR009057) もしくは STE 様ドメイン (IPR003120) を含むタンパク質をコードする推定ホメオボックス遺伝子が 10 個あることが認められた: Cob_11823、Cob_01690、Cob_10045、Cob_09008、Cob_10047、Cob_03876、Cob_10444、Cob_02655、Cob_09686 および Cob_06547 (図 1、2)。これらの最後の 1 つは病原性に関与することが報告されている *CST1* 遺伝子である (Tsuji et al. 2003b)。我々は残りの 9 個のホメオボックス遺伝子を *CoHox1* から *CoHox9* と名付けた。*CoHox5* はホメオボックスドメインに加えてロタネーゼ様ドメイン (IPR001763) を保存していた (図 2)。また、*CoHox7*、*CoHox8*、*CoHox9* および *CST1* は C₂H₂ ジンクフィンガードメイン (IPR0070087) を有していた (図 2)。

植物病原菌の *M. oryzae* および *B. cinerea* はそれぞれ 8 個および 9 個のホメオボックス遺伝子を有している (Kim et al. 2009; Antal et al. 2012)。これらの植物病原菌と *C. orbiculare* のホメオボックス遺伝子の系統解析により、植物病原菌のホメオボックス遺伝子が少なくとも 8 つのクレードに分類されることがわかった (図 1)。我々は 8 つのクレードを HOX1 グループから HOX8 グループと名付けた (図 1)。これにより、*C. orbiculare* のホメオボックス遺伝子の *CoHox1* は *M. oryzae* の *MoHOX5* および *B. cinerea* の *BcHox6* と同一の Hox5 グループに、*CoHox3* は *M. oryzae* の *MoHOX7* および *B. cinerea* の *BcHox1* と同一の Hox7 グループに属することがわかった。また、*CoHox7*、*CoHox8* および *CoHox9* の 3 つの遺伝子は HOX3 グループに属することがわかった。

2) *CoHox1* の解析

2-1) *CoHox1* 遺伝子破壊株および相補株の作出

ハイグロマイシン添加 PDA 培地から単離したハイグロマイシン耐性形質転換体約 200 菌株から、*CoHox1* 遺伝子破壊株を選抜するために PCR を行った (図 3)。PCR 反応のサイクル条件は PCR 反応液の組成は Takara Ex Taq のプロトコルに従い、PCR 反応のサイク

ル条件は 96°C 2 分を 1 サイクル、98 °C 15 秒、56 °C 45 秒、72 °C 1 分 30 秒を 40 サイクルで行った。*CoHox1* 遺伝子が存在するかを確認するために、*CoHox1* 遺伝子に結合するプライマーchk-*CoHox1*-INF および chk-*CoHox1*-INR を用いて PCR を行った (表 2)。この PCR 産物を電気泳動することで、野生株、エクトピック株および *CoHox1* 相補株において 0.5-kb の位置にバンドが認められた (図 3B)。また、相同組換えにより *CoHox1* 遺伝子が *HPH* 遺伝子に置き換わっていることを確認するために、ウリ類炭疽病菌のゲノムに結合するプライマーchk-*CoHox1*-LF と *HPH* 遺伝子に結合するプライマーchk-*CoHox1*-LR およびプライマーchk-*CoHox1*-RF と *HPH* 遺伝子に結合するプライマーchk-*CoHox1*-RR を用いて PCR を行った (表 2)。これらの PCR 産物を泳動することで、*CoHox1* 遺伝子破壊株および *CoHox1* 相補株においてそれぞれ 1.3-kb と 1.1-kb の位置にバンドが認められた (図 3C、D)。以上の結果より、ハイグロマイシン耐性形質転換体約 200 菌株から、*CoHox1* 遺伝子破壊株を 5 菌株選抜した。これら 5 菌株の表現型に差異が認められなかったことから (データ記載なし)、以降の試験には *CoHox1* 遺伝子破壊株として $\Delta CoHox1-20$ 株と $\Delta CoHox1-28$ 株を使用した。

2-2) *CoHox1* 遺伝子破壊株の特徴づけ

2-2-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較

CoHox1 遺伝子破壊株の菌そうは野生株と同様に黒くメラニン化し、違いは認められなかった (図 4)。菌そう直径において、野生株は約 36.3 mm であったのに対し、*CoHox1* 破壊株の $\Delta CoHox1-20$ 株と $\Delta CoHox1-28$ 株はそれぞれ 37.7 mm および 36.6 mm であり、 $\Delta CoHox1-20$ 株の菌そう直径のみ有意差が認められたが、顕著な差異ではなかった (表 4)。

分生孢子形成数において、野生株が約 39.8×10^6 孢子/コロニー、*CoHox1* 破壊株の $\Delta CoHox1-20$ 株と $\Delta CoHox1-28$ 株がそれぞれ 36.6 および 30.8×10^6 孢子/コロニーと有意な差異はなかった (表 4)。また、エクトピック株や *CoHox1* 相補株の菌そう直径や分生孢子形成に有意な差異は認められなかった。また、各菌株の分生孢子的大きさや形態にも差はなかった (データ記載なし)。

2-2-2) 宿主葉への病原性の観察

CoHox1 遺伝子破壊株の病原性について調査するため、宿主キュウリ子葉上での病斑形成を観察した。野生株、エクトピック株および *CoHox1* 相補株はキュウリ子葉上に炭疽病特

有の黄化を伴う褐色の病斑を形成した (図 5A)。一方で、*CoHox1* 破壊株は全く病斑を形成しなかった。次に、*CoHox1* 破壊株の宿主内伸展能力の調査のため、キュウリ子葉に傷をつけて病斑形成の有無を観察した。野生株、*CoHox1* 相補株は傷の有無に関わらず、病斑を形成した (図 5B)。有傷条件のコントロールとして用いたメラニン生合成に参与する *PKS1* 遺伝子の破壊株は、傷をつけた条件下でのみ病斑を形成した。*CoHox1* 破壊株は有傷条件下でも病斑を形成せず、認められた傷はネガティブコントロールの滅菌水を接種した時と同様であった。以上から、*CoHox1* 破壊株は宿主キュウリ子葉内での侵入菌糸の伸展が欠損していると考えられた。

2-2-3) ガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化の観察

CoHox1 遺伝子破壊株の病原性欠損の原因を調査するため、ガラスおよび人工セルロース膜上での表現型について調査した。ガラス面上において、*CoHox1* 遺伝子破壊株は野生株および *CoHox1* 相補株と比較して正常な付着器を形成した (図 6A)。付着器形成率は野生株、エクトピック株および *CoHox1* 相補株と有意な差は認められなかった (表 5)。人工セルロース膜上において、破壊株の付着器形成、侵入菌糸形成およびセルロースの分解によるハロー形成は野生株および *CoHox1* 相補株と比較して差異は認められなかった (図 6B)。また、各菌株のセルロース膜上での付着器形成率および侵入菌糸形成率に有意差は認められなかった (表 5)。以上から、*CoHox1* 破壊株の分生胞子のガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化は正常であったことがわかった。

2-2-4) *CoHox1* 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* の発現

CoHox1 遺伝子破壊株は宿主葉上で病斑形成ができなかったが、ガラス上および人工セルロース膜上での形態分化は野生株と類似しており正常であった。*CoHox1* 遺伝子破壊株の付着器形成が正常であるかを確認するために、付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* (Xue et al. 2002) のプロモーターに eGFP を付加したベクターを作成し、野生株および *CoHox1* 遺伝子破壊株に導入して eGFP 蛍光を観察した。その結果、ガラス上において、野生株で eGFP 蛍光が認められた条件において、*CoHox1* 遺伝子破壊株においても同様に eGFP 蛍光が観察された (図 7)。この結果から、*CoHox1* は付着器形成には関与していないことが示唆された。しかし、宿主葉上での *CoHox1* 遺伝子破壊株の eGFP 蛍光観察は行っていないため、宿主葉上での付着器形成についてはさらに調査する必要がある。

2-2-5) 宿主葉内での侵入菌糸の観察

CoHox1 遺伝子破壊株の分生胞子の形態分化が人工物理面上で正常であったことから、病原性欠損の原因は宿主葉上での形態分化に関与すると考えられる。そこで、キュウリ子葉上での *CoHox1* 破壊株の分生胞子の形態分化について観察を行った。*CoHox1* 破壊株は培養 72 時間後の時点で野生株と同様に付着器を形成していたが、侵入菌糸の数および侵入菌糸の伸長度合が野生株と異なっていた（データ記載なし）。そこで、侵入菌糸の形態を 3 つのタイプに分け、経時的に観察を行った。野生株 104-T 株では、キュウリ子葉に接種 48、60 時間後において、植物細胞に貫入直後（Type 1）もしくは 1 つの植物細胞内に伸長していた侵入菌糸（Type 2）は約 10% 観察されたが、隣接した植物細胞に伸展した侵入菌糸（Type 3）は 2~3% とわずかにしか見られなかった（図 8A）。接種 72 時間以降は、Type 3 の侵入菌糸が増加し、野生株の侵入菌糸が正常に伸展していることがわかった。一方、*CoHox1* 破壊株では、接種 48、60 時間後において、侵入菌糸の形成は認められたが、全侵入菌糸の割合が 22% の野生株と比較して 10% と低下していた（図 8B）。接種 72 時間以降において、*CoHox1* 破壊株の全侵入菌糸の割合はわずかに増加しているが野生株よりも少なく、*CoHox1* 破壊株の侵入菌糸の多くは Type 1 の侵入菌糸であった。また、*CoHox1* 破壊株において、隣接した植物細胞にまで伸展した侵入菌糸はほとんど認められなかった。したがって、*CoHox1* 破壊株が病原性を欠損した原因は、宿主植物内での侵入菌糸形成の低下および侵入菌糸の伸長の停止であると示唆された。

2-2-6) 熱処理した宿主葉への病原性の観察

CoHox1 遺伝子破壊株の侵入菌糸の伸長停止の原因として、宿主植物の抵抗性が強く誘導されたためであることが考えられる。そこで、熱処理により抵抗性を低下させた宿主植物を用いて、*CoHox1* 破壊株が病斑形成を行うかを調査した。野生株および *CoHox1* 相補株は 25 °C の水および 50 °C の温湯で熱処理したキュウリ子葉上で病斑を形成した（図 9）。しかし、*CoHox1* 破壊株は 50 °C で熱処理したキュウリ子葉上でも病斑を形成しなかった。この結果から、宿主植物の抵抗性を低下させても *CoHox1* 遺伝子破壊株は病斑を形成できず、*CoHox1* 遺伝子破壊株の感染阻止に宿主植物の抵抗性誘導が関与していないことが示唆された。

2-2-7) 蛍光タンパク質 eGFP を用いた長期培養時の宿主内での生存

CoHox1 遺伝子破壊株の侵入菌糸の伸長停止の原因として、侵入菌糸が宿主内にて途中で死滅していることが考えられる。そこで、恒常的に発現する *GPD1* 遺伝子のプロモーターに eGFP を融合したベクターを作成し、*CoHox1* 破壊株に導入し、長期培養後に eGFP 蛍光を観察した。培養 19 日後、*CoHox1* 破壊株の侵入菌糸のほとんどは侵入した植物細胞の隣接細胞にまで伸展していなかったが、ベクター導入株の侵入菌糸で eGFP 蛍光が観察された (図 10)。この結果は、*CoHox1* 破壊株の侵入菌糸は宿主植物内で長期間生存していることを示唆している。

2-2-8) 分離法を用いた長期培養時の宿主内での生存

CoHox1 遺伝子破壊株の侵入菌糸が宿主葉内で接種 19 日後でも生存していることが認められたが、*CoHox1* 遺伝子破壊株は宿主侵入率が野生株よりも低いことから、観察が容易ではなかった。そこで、*CoHox1* 遺伝子破壊株を接種して長期培養した宿主葉から分離できるかを調査した。今回の試験では、分離作業前に葉の表面消毒を行ったため、宿主葉内で生存している菌を分離したと考える。ポジティブコントロールとして用いた *CoHox1* 遺伝子相補株は、宿主葉上で 21 日培養した場合においても分離することができた (図 11、表 6)。一方、ネガティブコントロールとして用いた *CST1* 遺伝子破壊株は、宿主葉上で 21 日培養後に分離することができなかった。この結果は、*CST1* 遺伝子破壊株が宿主葉内に侵入できず死滅していたためと思われる。また、*CoHox1* 遺伝子破壊株は宿主葉上で 21 日培養した場合でも分離することができた (図 11、表 6)。この結果は、*CoHox1* 遺伝子破壊株の侵入菌糸が宿主内で生存していることを示唆しており、*CoHox1* 遺伝子破壊株の侵入菌糸伸展の欠損の原因が宿主侵入の途中で死滅しているためではないことがわかった。

3) *CoHox3* の解析

3-1) *CoHox3* 遺伝子破壊株の作出

ハイグロマイシン添加 PDA 培地から単離したハイグロマイシン耐性形質転換体 34 菌株から、*CoHox3* 遺伝子破壊株を選抜するために、*CoHox1* 遺伝子破壊株の選抜と同様に PCR を行った (図 12)。*CoHox3* 遺伝子が存在するかを確認するために、*CoHox3* 遺伝子に結合するプライマー chk-*CoHox3*-INF および chk-*CoHox3*-INR を用いて PCR を行った (表 3)。PCR 反応のサイクル条件は 96 °C 2 分を 1 サイクル、98 °C 15 秒、60 °C 45 秒、72 °C 1 分

30 秒を 40 サイクルで行い、この PCR 産物を電気泳動することで、0.6-kb の位置にバンドが認められた (図 12B)。また、相同組換えにより *CoHox3* 遺伝子が *HPH* 遺伝子に置き換わっていることを確認するために、ウリ類炭疽病菌のゲノムに結合するプライマーchk-*CoHox3*-LF と *HPH* 遺伝子に結合するプライマーchk-*HPH*-F およびプライマーchk-*CoHox3*-RR と *HPH* 遺伝子に結合するプライマーchk-*HPH*-R を用いて PCR を行った (表 2)。これらの PCR 産物を泳動することで、どちらのプライマーペアを用いた条件でも 1.3-kb の位置にバンドが認められた (図 12C、D)。ハイグロマイシン耐性形質転換体 34 菌株から *CoHox3* 遺伝子破壊株として 5 菌株を選抜した。これら 5 菌株の表現型に差異が認められなかったことから (データ記載なし)、以降の試験は、*CoHox3* 遺伝子破壊株として $\Delta CoHox3-5$ 株および $\Delta CoHox3-6$ 株を使用した。

3-2) *CoHox3* 遺伝子破壊株の特徴づけ

3-2-1) 菌そう生育および分生孢子形成数の比較

CoHox3 遺伝子破壊株の菌そうは野生株と同様に黒くメラニン化し、違いは認められなかった (図 13)。菌そう直径において、野生株は約 34.3 mm であったのに対し、*CoHox3* 破壊株の $\Delta CoHox3-5$ 株と $\Delta CoHox3-6$ 株はそれぞれ 35.0 mm および 34.5 mm であり、野生株と *CoHox1* 破壊株の菌そう直径に有意差は認められなかった (表 7)。エクトピック株と *CoHox3* 相補株の菌そう直径において、野生株と有意差が認められたが、顕著な差ではなかった。

分生孢子形成数において、野生株が約 32.2×10^6 孢子/コロニー、*CoHox1* 破壊株の $\Delta CoHox3-5$ 株と $\Delta CoHox3-6$ 株がそれぞれ 20.5 および 19.9×10^6 孢子/コロニーと有意な異はなかった (表 7)。また、各菌株の分生孢子的大きさや形態にも差はなかった (データ記載なし)。

3-2-2) 宿主葉への病原性の観察

CoHox3 遺伝子破壊株の病原性について調査するため、宿主キュウリ子葉上での病斑形成について観察した。各菌株の孢子懸濁液を 1×10^5 孢子/mL に調整し、キュウリ子葉上で 7 日間培養した時、野生株および *CoHox3* 相補株の病斑形成率が約 97% だったのに対し、*CoHox3* 破壊株の病斑形成率は約 50% と病原性が低下していた (データ記載なし)。*CoHox3* 破壊株の病原性についてさらに調査するため、各菌株の孢子懸濁液を低濃度 (1×10^4 孢子

/mL ; 図 14A) と高濃度 (1×10^6 孢子/mL ; 図 14B) に調整し、病斑形成について観察した。野生株および *CoHox3* 相補株は孢子濃度に関係なくキュウリ子葉上で病斑を形成した (図 14)。一方、*CoHox3* 破壊株は孢子懸濁液が高濃度の時、野生株と同様に病斑を形成したが、低濃度の時には全く病斑を形成しなかった。よって、*CoHox3* 破壊株は病原性が低下しており、病斑形成が孢子濃度に依存していることがわかった。

3-2-3) ガラスおよび人工セルロース膜上での形態分化の観察

CoHox3 遺伝子破壊株の病原性低下の原因を調査するため、人工物理面上での形態分化を観察した。スライドガラス面上において、野生株および *CoHox3* 相補株はメラニン化した成熟付着器を約 82% 形成した (図 15A)。一方で、*CoHox3* 破壊株は正常な付着器を形成せず、菌糸が伸長したものや一部が膨れた構造を形成したものなど複数の形態が観察された (図 15B)。そこで、*CoHox3* 破壊株の形態を 4 つのタイプ (Type 1 から Type 4) に分け、測定を行った。付着器様構造を形成した Type 1 の形成率は約 0.8% と低く、ほとんどは菌糸が伸長していた。菌糸が伸長し一部が膨れて薄いメラニン化を伴う Type 2 の形成率は約 16%、薄くメラニン化して菌糸伸長した Type 3 の形成率が最も多く約 53%、菌糸伸長した Type 4 が約 28% であった。よって、*CoHox3* 破壊株の病原性低下の原因として、正常な付着器を形成できていなかったことが考えられる。

0.5 M スクロース溶液下で野生株の孢子を培養すると、付着器を形成せずに菌糸が伸長することがわかっている (Suzuki et al. 1981)。そこで、野生株と *CoHox3* 破壊株の孢子を 0.5 M スクロース溶液で培養したところ、両菌株ともに付着器を形成せず、メラニン着色の無い菌糸を伸長した (図 15C)。*CoHox3* 遺伝子破壊株を滅菌水で培養した時の形態では菌糸の一部が薄くメラニン化したものや膨れた形状を伴うものがあり、0.5 M スクロース溶液下で培養した時の形態と異なっていた。この結果は、*CoHox3* が付着器形成の開始時ではなく成熟過程に関与しているかもしれないことを示唆している。

次に、人工セルロース膜上での形態分化を観察した。セルロース膜上で、野生株および *CoHox3* 相補株は侵入菌糸をそれぞれ約 65% および約 71% 形成した (図 16)。一方で、*CoHox3* 破壊株はガラス面上と同様に、正常な付着器を形成せず、付着器様構造や菌糸の先端からまれに侵入菌糸を形成した (約 7%)。よって、*CoHox3* 破壊株は正常な付着器を形成できないが、人工セルロース膜内にまれに侵入菌糸を形成できることを明らかにした。

3-2-4) 宿主葉内での侵入菌糸の観察

CoHox3 遺伝子破壊株が宿主葉上で付着器および侵入菌糸を形成するかを観察するため、キュウリ子葉上での形態分化を観察した。キュウリ子葉上で 72 時間培養後、野生株は付着器から侵入菌糸を形成し、その侵入菌糸形成率は 36–47%であった (図 17、表 8)。一方で、*CoHox3*破壊株はキュウリ子葉上で付着器を形成せず、その形態は人工物理面上と類似していた。また、侵入菌糸は膨れた構造や菌糸の先端から形成されており、侵入菌糸形成率は 0.3–0.6%であった。この結果から、*CoHox3* 破壊株がキュウリ子葉上でも付着器形成が欠損しており、侵入菌糸形成率が野生株の 100 分の 1 に低下していたことがわかった。

3-2-5) *CoHox3* 遺伝子破壊株における付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* の発現

人工物理面上および宿主葉上で *CoHox3* 遺伝子破壊株が正常な付着器を形成できていなかったことから、付着器特異的に発現する *CoGAS1* が (Xue et al. 2002)、*CoHox3* 遺伝子破壊株が形成した発芽胞子で発現するかを調査した。*CoGAS1* プロモーターに eGFP を融合した遺伝子を導入した株を作成し、胞子発芽時の eGFP 蛍光を観察したところ、野生株では培養 8 時間後に弱い eGFP 蛍光が観察され、培養 12 時間および 24 時間で強い蛍光が認められた (図 18、データ記載なし)。一方、*CoHox3*破壊株は付着器様の膨れた構造を形成していた形態においても eGFP 蛍光が認められなかった。また、0.5 M スクロース溶液下で菌糸伸長した野生株および *CoHox3*破壊株において、eGFP 蛍光は観察されなかった。この結果は、*CoHox3*破壊株が *CoGAS1* を発現していないことを示唆している。

3-2-6) 胞子発芽時の核分裂の観察

C. orbiculare は付着器形成時に特有の核分裂を行うことが知られている (Suzuki et al. 1982 ; Takano et al. 2001)。*C. orbiculare* の分生胞子は単核であり、付着器形成に伴い核分裂を起こし、1 つの核が付着器に移行し、付着器が成熟すると分生胞子内の核が消失する。*CoHox3* 遺伝子破壊株は野生株と異なり成熟した付着器を形成できない。そこで、*CoHox3* 破壊株の胞子発芽時の核分裂について経時的に観察を行った。核を可視化するために、*B. cinerea* ヒストン *H2B* 遺伝子に赤色蛍光タンパク質 mCherry を付加し、野生株および *CoHox3*破壊株に導入した。野生株において、核分裂は培養 6 時間後に約 80%、培養 8 時間後に約 98%だった (図 19A、B)。その後、培養 10 時間後に分生胞子内の核が消失した。一方、*CoHox3*破壊株において、核分裂は培養 6 時間後ではほとんど認められず、培養 12

時間後で約 90%となった。また、*CoHox3* 破壊株の核は分生孢子内に残存していたり、菌糸内に複数に分裂していたりと野生株とは異なっていた（データ記載なし）。この結果は、*CoHox3* 破壊株の核分裂が野生株よりも遅かったことを示唆している。0.5 M スクロース溶液下で培養した時、野生株および *CoHox3* 破壊株のどちらも菌糸が伸長し、付着器を形成する滅菌水で培養した野生株よりも核分裂が遅かった。以上から、*CoHox3* は付着器形成時の核分裂に関与していることが示唆された。

第4章 考察

C. orbiculare の病原性関連遺伝子の探索のため、AtMT法を用いて *C. orbiculare* の野生株 104-T 株のゲノムへ T-DNA をランダムに挿入した。その結果、*C. orbiculare* のランダム突然変異株を約 2,000 菌株作出し、全菌株において宿主葉への病原性を調査した結果、14 菌株の病原性欠損変異株を得ることができた。これらの変異遺伝子を TAIL-PCR により調査した結果、12 個の推定病原性関連遺伝子を得ることができた。これら推定病原性関連遺伝子のうち、ホメオボックス転写因子をコードする遺伝子に注目し、*CoHox1* と名付け、その機能を解析した。また、病原性の低下が認められたホメオボックス遺伝子 *CoHox3* についても機能解析を行った。

まず、*C. orbiculare* のホメオボックス転写因子 *CoHox1* の機能解析のために、*C. orbiculare* の野生株 104-T 株を親株として *CoHox1* 遺伝子破壊株を作成し、その表現型解析を行った。*CoHox1* 遺伝子破壊株の表現型解析を行った結果、*CoHox1* 遺伝子破壊株はガラスおよび人工セルロース膜上で形態分化が正常であったのに対し、宿主葉上で病斑を形成できず、*CoHox1* 遺伝子破壊株の宿主葉への侵入率の低下および宿主細胞内での侵入菌糸の伸長が途中で停止していた。この原因として、①宿主の抵抗性を強く誘導したため、②侵入菌糸が途中で死滅したため、もしくは③侵入菌糸の形態分化が欠損したための 3 つが考えられたことから、それらについて調査を行った。細胞壁生合成の調節因子である酵母 *S. cerevisiae* SSD1 のホモログである *C. orbiculare* ClaSSD1 は宿主植物の抵抗性誘導に関与していることが報告されている (Tanaka et al. 2007)。報告によると、*C. orbiculare* の *classd1* 遺伝子破壊株は宿主葉への侵入が欠損していたが、熱処理したキュウリ子葉上で病斑を形成した。また、*classd1* 遺伝子破壊株はキュウリ葉上で付着器を形成していたが、野生株と比較してカロスパピラ形成が増加していた。そこで、*classd1* 遺伝子破壊株の解析方法を参考に、*CoHox1* 遺伝子破壊株において、病原性欠損の原因が宿主植物の抵抗性誘導に関与しているかを調査するために、宿主葉を熱処理して病斑形成の有無を観察した。その結果、*CoHox1* 遺伝子破壊株は熱処理した宿主葉上でも 25 °C 温湯処理葉上と同様に病斑を形成しなかった。また、*CoHox1* 遺伝子破壊株の侵入時におけるパピラ形成について観察を行ったが、野生株と顕著な差は観察できなかった (データ記載なし)。以上の結果から、*C. orbiculare* の *CoHox1* と宿主抵抗性には関連がないことが示唆された。次に、侵入菌糸が途中で死滅したことで *CoHox1* 遺伝子破壊株の病原性が欠損したかについて調査を行うため、宿主に接種後、長期間培養し、*CoHox1* 遺伝子破壊株の生存の有無について eGFP を用

いて観察した。GPD1 プロモーター-eGFP を導入した *CoHox1* 遺伝子破壊株を宿主葉に接種し、19 日間培養後に eGFP 蛍光を観察した結果、侵入菌糸に eGFP 蛍光が認められた。また、*CoHox1* 遺伝子破壊株の接種葉を 21 日間培養し、分離を行った結果、菌そうの生育が認められた。したがって、*CoHox1* 遺伝子破壊株は長期培養時に、侵入菌糸の伸長が認められなかったが、宿主葉内で生存しており、侵入菌糸が途中で死滅しているわけではないことが示唆された。以上から、*CoHox1* 遺伝子破壊株の病原性欠損の原因は侵入菌糸の形態分化が欠損したためであると推測された。ヘミバイオトロフィック菌において、宿主への感染時に侵入菌糸がバイオトロフィック状態からネクロトロフィック状態へスイッチする機構が近年注目され、研究が盛んに行われているが、その詳細は未だ明らかになっていない。*CoHox1* も侵入菌糸の形態形成に関与することが示唆されたことから、バイオトロフィック状態からネクロトロフィック状態へのスイッチに関与するかもしれない。*C. orbiculare* において、酵母のストレス応答制御因子のホモログである *CoWHI2* が侵入菌糸のバイオトロフィック状態に関与していることが報告されている (Harata et al. 2016)。*Cowhi2* 遺伝子破壊株は侵入菌糸および病斑の形成は認められるが、バイオトロフィーの関連遺伝子 *CoATF1* および *CoPSD1* のプロモーター-VENUS 導入株の蛍光強度が有意に低下していた。よって、*CoWhi2* が *C. orbiculare* の侵入菌糸のバイオトロフィック状態において重要であることが示唆されている。また、*CoWhi2* は TOR (ラパマイシンターゲット) シグナル伝達にも関与しており、*CoWhi2* 遺伝子破壊株では宿主植物の防御応答が強く誘導されていた。*CoHox1* もまた、侵入菌糸の形態分化に関与していたことから、既知の遺伝子と共に更なる研究を行うことで *C. orbiculare* の侵入菌糸の形態分化の解明に貢献すると期待する。

また、今回の調査の結果、*CoHox1* たった 1 つで *C. orbiculare* の侵入菌糸の形態分化に機能していることが示唆された。*CoHox1* 遺伝子破壊株は宿主内に侵入菌糸を形成したが、その菌糸は長期間培養した場合でも生存が確認された。一方、宿主植物に侵入できない *CST1* 遺伝子破壊株は長期間培養した場合に生存が確認できなかった。これらの結果は、*CoHox1* 遺伝子破壊株が単に宿主内で菌糸生育が止まったのではなく、宿主植物と共生状態のままであったと考えられる。*C. orbiculare* の宿主植物へのバイオトロフィック状態やネクロトロフィック状態に関与する遺伝子についてはいくつか報告があるが、バイオトロフィック状態からネクロトロフィック状態へのスイッチについては全くの未知であり、*CoHox1* 遺伝子がこの部分に関与している重要な遺伝子であることが期待される。

C. orbiculare の CoHox1 と同じ HOX5 グループである *M. oryzae* の MoHOX5 については、遺伝子破壊株による表現型解析が行われ、病原性に関与しないことが報告されている (Kim et al. 2009)。このことは、*C. orbiculare* の CoHox1 が *M. oryzae* における MoHOX5 とは異なる機能を有していることを示唆している。しかし、正確な判断を行うためには、それぞれのホメオボックス転写因子がそれぞれの遺伝子破壊株で相補的に機能するかどうかについて評価しなければならないだろう。

C. orbiculare のホメオボックス転写因子の 1 つである *CoHox3* 遺伝子についても、遺伝子破壊株を作出し、その表現型解析を行った。その結果、*CoHox3* 遺伝子破壊株は、宿主キュウリ葉への病原性が低下し、付着器形成が欠損していた。CoHox3 と同じ HOX7 グループである *M. oryzae* の MoHOX7 は、*C. orbiculare* の CoHox3 と同様に付着器形成に関与していることが報告されていることから (Kim et al. 2009)、HOX7 グループは共通した機能を有していることが考えられる。しかし、HOX7 グループの発芽胞子のメラニン化については *C. orbiculare* と *M. oryzae* で異なっていた。*CoHox3* 遺伝子破壊株の発芽胞子は野生株のような付着器を形成せず、ほとんどが伸長した菌糸を形成し、発芽胞子の約 70% がメラニン化、発芽胞子の約 16% がわずかに膨れた構造を形成した。一方、*M. oryzae* の *Mohox7* 遺伝子破壊株は正常な付着器を形成せず、着色のない膨潤して折れ曲がった構造を形成した (Kim et al. 2009)。*M. oryzae* は *C. orbiculare* とは異なり、発芽胞子だけでなく菌糸先端でも付着器を形成することが知られており、*MoHOX7* 遺伝子破壊株は、菌糸先端で形成した膨潤して折れ曲がった構造においても発芽胞子と同様の形態を示した。

HOX7 グループは *C. orbiculare* および *M. oryzae* において宿主侵入に重要である。*CoHox3* 遺伝子破壊株は宿主葉上で正常な付着器を形成できず、わずか 0.3~0.6% の発芽胞子しか宿主侵入できなかったが、一方で、有傷葉上にて病斑形成が認められた (データ記載なし)。*M. oryzae* においても、*Mohox7* 遺伝子破壊株は宿主イネ葉上で病斑を形成できず、シリンジを用いて宿主葉へ胞子懸濁液を注入された場合において病斑形成が認められた (Kim et al. 2009)。この結果は、*C. orbiculare* および *M. oryzae* において、HOX7 グループが宿主植物への貫入に関与することを示唆している。*M. oryzae* の *Mohox7* 遺伝子破壊株での報告はないが、*C. orbiculare* の *CoHox3* 遺伝子破壊株において、付着器特異的に発現する *CoGAS1* 遺伝子のプロモーターに eGFP を付加し、胞子発芽時の発現を観察した結果、野生株で認められた eGFP 蛍光を *CoHox3* 遺伝子破壊株で認められなかった。このことは、*CoGAS1* 遺伝子が発現するレベルまで成熟した付着器を *CoHox3* 遺伝子破壊株が

形成できていなかったと思われる。しかし、*C. orbiculare* の CoGAS1 の機能については、詳しくわかっていないため、今後はこの調査も必要である。

さらに、今回の研究により、CoHox3 が *C. orbiculare* の付着器形成時に特異的に起こる核分裂に関与していることを示唆した。発芽胞子の核分裂は *M. oryzae* の *Mohox7* 遺伝子破壊株では解析されていないため、HOX7 グループが付着器形成時の核分裂に関与しているかを知るためには調査する必要があるだろう。

C. orbiculare はホメオボックス転写因子を 10 個保有しており、これまでに示した CoHox1 と CoHox3 以外では、CST1 が付着器侵入に関与していることが示されている (Tsuji et al. 2003b)。他の *C. orbiculare* のホメオボックス転写因子の CoHox2 について遺伝子破壊株を用いて表現型を調査した (小幡 2018)。その結果、*CoHox2* 遺伝子破壊株は分生胞子形成が顕著に低下し、一方で菌そう上で形成される剛毛が増加した。CoHox2 のホモログである *M. oryzae* の MoHOX2 および *Fusarium* 属菌の Htf1 もまた分生胞子形成に関与しており (Kim et al. 2009 ; Zheng et al. 2012) 、これらが所属する HOX2 グループの機能が広範囲の植物病原菌で共通であることが期待される。CoHox4 においても遺伝子破壊株を作成して表現型解析を行った結果、CoHox4 が菌糸生育や分生子の形状、付着器形成など感染過程の各段階に関与しており、病原性にも関与していることがわかった (小幡 2018)。CoHox4 のホモログである *M. oryzae* MoHOX1 および *B. cinerea* BcHOX8 においても、菌糸生育および病原性に関与していたことから (Kim et al. 2009 ; Antal et al., 2012)、これらが属する HOX1 グループもまた、機能的に共通していることが示唆された。また、CoHox6、CoHox7 および CoHox9 については、それぞれの遺伝子破壊株を作成して表現型解析を行ったが、野生株との差は認められず、単独では病原性に関与していないことが示唆された (小幡 2018 ; 丹羽 2017 ; 森 2018)。ホメオボックス転写因子の CoHox7、CoHox8 および CoHox9 においては、同一の HOX3 グループに属し、類似の配列を有することから、複合的に機能している可能性もある。よって、さらなる調査のためには、二重もしくは三重遺伝子破壊を行って、その表現型の評価をする必要があると思われる。その他の CoHox5、CoHox8 については、未だ解析中である。これらの結果を *C. orbiculare* の感染過程図に示した (図 20 ; 表 9)。*C. orbiculare* のホメオボックス転写因子のうち少なくとも 5 つは感染過程に関与していたことがわかった。このことから、*C. orbiculare* の感染過程の進行に伴い、ホメオボックス遺伝子が次々に発現して行っていることが予想される。今後、各ホメオボックス遺伝子が感染過程のどの段階で発現しているかを調査したい。以上から、*C.*

*orbiculare*におけるホメオボックス転写因子が感染の様々な段階に関与し、重要な因子であることを明らかにすることができた。

摘要

本研究では、ウリ類炭疽病菌 *Colltotrichum orbiculare* の病原性欠損変異株 Path-9 株から得られたホメオボックス遺伝子 *CoHox1* およびその他のホメオボックス遺伝子について解析を行った。ホメオボックス転写因子は様々な生物の形態分化に関与していることが知られている。我々は *C. orbiculare* 野生株 104-T 株の *CoHox1* 遺伝子を破壊し、その表現型解析を行った。その結果、*CoHox1* 遺伝子破壊株は宿主キュウリ葉への病原性が欠損していた。*CoHox1* 遺伝子破壊株はガラスおよび人工セルロース膜上では野生株と同様に付着器および侵入菌糸を形成していた。一方、*CoHox1* 遺伝子破壊株は宿主キュウリ葉へ侵入するものの、侵入菌糸の伸長が認められなかった。また、熱処理を行ったキュウリ葉上においても、*CoHox1* 遺伝子破壊株は病斑形成ができなかった。*CoHox1* 遺伝子破壊株が宿主葉上で長期間培養した時に生存するかについて観察した結果、eGFP を用いた場合、および分離法を用いた場合においても *CoHox1* 遺伝子破壊株の生存が確認された。これらの結果から、*CoHox1* は宿主内での侵入菌糸の伸展に関与していると思われた。

もう 1 つの *CoHox3* についても同様に *CoHox3* 遺伝子破壊株を作出して表現型解析を行った。*CoHox3* 遺伝子破壊株は宿主キュウリ葉への病原性が低下していた。一方、宿主葉に傷つけた場合、*CoHox3* 遺伝子破壊株は野生株と同様に病斑を形成した。ガラスおよび人工セルロース膜上において、*CoHox3* 遺伝子破壊株は正常な付着器を形成せず、人工セルロース膜上で野生株の侵入率が約 65%であったのに対し、*CoHox3* 遺伝子破壊株の侵入率はわずか約 7%であった。また、宿主キュウリ葉への侵入率は野生株が 36-47%に対して *CoHox3* 遺伝子破壊株は 0.3-0.6%であった。さらに *CoHox3* 遺伝子破壊株について調査するために、付着器特異的に発現する *CoGAS1* のプロモーターに eGFP を付加し、野生株と *CoHox3* 遺伝子破壊株に導入し、胞子発芽時の観察を行った。その結果、*CoHox3* 遺伝子破壊株は付着器様の膨れた構造を形成した発芽胞子であっても eGFP 蛍光が観察されなかった。このことから、*CoHox3* 遺伝子破壊株は付着器特異的な *CoGAS1* を発現できていないことがわかった。*C. orbiculare* は付着器形成時に特異的な核分裂を行う。そこで、*CoHox3* 遺伝子破壊株の胞子発芽時の核分裂について調査した。その結果、*CoHox3* 遺伝子破壊株の核分裂は野生株よりも遅れていた。このことは、*CoHox3* が付着器形成時の核分裂に関与していることを示唆している。

引用文献

- Antal Z, Rascele C, Cimerman A, Viaud M, Billon-Grand G, Choquer M, Bruel C, 2012. The homeobox BcHOX8 gene in *Botrytis cinerea* regulates vegetative growth and morphology. *PLoS ONE* 7: e48134; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048134>.
- Burglin TR, Affolter M, 2015. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* 125: 497–521; <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0543-8>.
- Carroll AM, Sweigard JA, Valent B, 1994. Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Newsletter* 41: 22; <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1367>.
- Gan P, Ikeda K, Irieda H, Narusaka N, O'Connell RJ, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, Shirasu K, 2013. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytologist* 197: 1236–1249; <https://doi.org/10.1111/nph.12085>.
- Errede B, Ammerer G, 1989. STE12, a protein involved in cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast, is part of protein-DNA complexes. *Genes and Development* 3: 1349–1361; <https://doi.org/10.1101/gad.3.9.1349>.
- Harata K, Nishiuchi T, Kubo Y, 2016. *Colletotrichum orbiculare* WHI2, a yeast stress-response regulator homolog, controls the biotrophic stage of hemibiotrophic infection through TOR signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29: 468–483; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-02-16-0030-R>.
- Hoi JWS and Dumas B, 2010. Ste12, Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. *Eukaryotic Cell* 9: 480–485; <https://doi.org/10.1128/EC.00333-09>.
- Hoi JWS, Herbert C, Bacha N, O'Connell R, Lafitte C, Borderies G, Rossignol M, Rouge P, Dumas B, 2007. Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Microbiology* 64: 68–82; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05639.x>.
- Huser A, Takahara H, Schmalenbach W, O'Connell R, 2009. Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 143–156; <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0143>.

- Izumitsu K, Yoshimi A, Kubo D, Morita A, Saitoh Y, Tanaka C, 2009. The MAPKK kinase ChSte11 regulates sexual/asexual development, melanization, pathogenicity, and adaptation to oxidative stress in *Cochliobolus heterostrophus*. *Current Genetics* 55: 439–448; <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0257-7>.
- Kim S, Park S-Y, Kim KS, Rho H-S, Chi M-H, Choi J, Park J, Kong S, Park J, Goh J, Lee Y-H, 2009. Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics* 5: e1000757; <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000757>.
- Kimura A, Takano Y, Furusawa I, Okuno T, 2001. Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. *The plant cell* 13: 1945–1957; <https://doi.org/10.1105/TPC.010084>.
- Kubo Y, Takano Y, 2013. Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology* 79: 233–242; <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0451-9>.
- 小玉紗代, 2012. AtMT 法を用いたウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株の選抜と解析 滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科卒業論文 pp.1–26.
- 小松香織, 2014. ウリ類炭疽病菌における enoyl-CoA hydratase 遺伝子破壊株の解析 滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科卒業論文 pp.1–26.
- Liu H-L, De Souza CP, Osmani AH, Osmani SA, 2009. The three fungal transmembrane nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans* are dispensable in the presence of an intact An-Nup84-120 complex. *Molecular biology of the cell* 20: 616–630; <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-06-0628>.
- 前田 瞳, 2011. AtMT 法を用いたウリ類炭疽病菌の病原性変異株の選抜 滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科卒業論文 pp.1–20.
- 丸山麻美, 2011. AtMT 法を用いたウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株の作出と解析 滋賀県立大学大学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1–41.
- McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ, 1984. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37: 403–408; [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90370-2](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(84)90370-2).
- 水口博貴, 2017. ウリ類炭疽病菌の病原性発現における脂肪酸代謝の役割 滋賀県立大学大

- 学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1–26.
- 森 瑞希, 2018. ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写制御因子 CoHox9 の機能解析
滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科卒業論文 pp.1–32.
- Namiki F, Matsunaga M, Okuda M, Inoue I, Nishi K, Fujita Y, Tsuge T, 2001. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 580–584; <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.4.580>.
- 丹羽日朗, 2016. AtMT 法で作出したウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株における破壊遺伝子の解析 滋賀県立大学大学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1–30.
- 丹羽亜由美, 2017. ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写制御因子 CoHox7 の機能解析 滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科卒業論文 pp.1–24.
- O’Connell R, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan A, Altmuller J, Alvarado-Balderrama L, Bauser CA, Becker C, Birren BW, Chen Z, Choi J, Crouch JA, Duvick JP, Farman MA, Gan P, Heiman D, Henrissat B, Howard RJ, Kabbage M, Koch C, Kracher B, Kubo Y, Law AD, Lebrun M-H, Lee Y-H, Miyara I, Moore N, Neumann U, Nordstrom K, Panaccione DG, Panstruga R, Place M, Proctor RH, Prusky D, Rech G, Reinhardt R, Rollins JA, Rounsley S, Schardl CL, Schwartz DC, Shenoy N, Shirasu K, Sikhakolli UR, Stuber K, Sukno SA, Sweigard JA, Takano Y, Takahara H, Trail F, van der Does HC, Voll LM, Will I, Young S, Zeng Q, Zhang J, Zhou S, Dickman MB, Schulze-Lefert S, van Themmat EVL, Ma L-J, Vaillancourt LJ, 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *NATURE GENETICS* 44: 1060–1065; <https://doi.org/10.1038/ng.2372>.
- 小幡善也, 2018. ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写制御因子 CoHox2、CoHox4 および CoHox6 の機能解析 滋賀県立大学大学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1–71.
- Park G, Xue C, Zheng L, Lam S, Xu J-R, 2002. MST12 regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 183–192; <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.183>.
- Rispail N, Di Pietro A, 2010. The homeodomain transcription factor Ste12 connecting fungal MAPK signaling to plant pathogenicity. *Communicative and Integrative*

- Biology* 3: 327–332; <https://doi.org/10.4161/cib.3.4.11908>.
- Schamber A, Leroch M, Diwo J, Mendgen K, Hahn M, 2010. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 11: 105–119; <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00579.x>.
- Schiestl RH, Petes TD, 1991. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 7585–7589; <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7585>.
- Scott MP, Weiner AJ, 1984. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 4115–4119.
- Sumita T, Izumitsu K, Tanaka C, 2017. Characterization of the autophagy-related gene *BmATG8* in *Bipolaris maydis*. *Fungal Biology* 121: 785–797; <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.008>.
- Suzuki K, Furusawa I, Ishida N, Yamamoto M, 1981. Protein synthesis during germination and appressorium formation of *Colletotrichum lagenarium* spores. *Journal of General Microbiology* 124: 61–69; <https://doi.org/10.1099/00221287-124-1-61>.
- Suzuki K, Kubo Y, Furusawa I, Ishida N, Yamamoto M, 1982. Behavior of colorless appressoria in an albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 1210–1213; <https://doi.org/10.1139/m82-180>.
- 鈴木一実, 横山 綾, 多々良康香, 谷口拓矢, 小松香織, 加藤春奈, 丹羽日朗, 入江俊一, 泉津弘佑, 2014. ウリ類炭疽病菌における病原性関連遺伝子の機能解析. 植物感染生理談話会論文集 第49号 pp.11–19.
- Takano Y, Kikuchi T, Kubo Y, Hamer J, Mise K, Furusawa I, 2000. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 374–383; <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.374>.

- Takano Y, Oshiro E, Okuno T, 2001. Microtubule dynamics during infection-related morphogenesis of *Colletotrichum lagenarium*. *Fungal Genetics and Biology* 34: 107–121; <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1293>.
- Tanaka S, Yamada K, Yabumoto K, Fujii S, Huser A, Tsuji G, Koga H, Dohi K, Mori M, Shiraishi T, O'Connell R, Kubo Y, 2007. *Saccharomyces cerevisiae* SSD1 orthologues are essential for host infection by the ascomycete plant pathogens *Colletotrichum lagenarium* and *Magnaporthe grisea*. *Molecular Microbiology* 64: 1332–1349; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05742.x>.
- 谷口拓矢, 2014. ウリ類炭疽病菌における cAMP phosphodiesterase 遺伝子の機能解析 滋賀県立大学大学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1-34.
- 多々良康香, 2013. ウリ類炭疽病菌における脂肪酸の β 酸化と病原性発現との関係 滋賀県立大学大学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1-47.
- Tsuji G, Fujii S, Fujihara N, Hirose C, Tsuge S, Shiraishi T, Kubo Y, 2003a. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of General Plant Pathology* 69: 230–239; <http://doi.org/10.1007/s10327-003-0040-4>.
- Tsuji G, Fujii S, Tsuge S, Shiraishi T, Kubo Y, 2003b. The *Colletotrichum lagenarium* Ste12-like gene CST1 is essential for appressorium penetration. *Molecular plant-Microbe Interactions* 16: 315–325; <http://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.4.315>.
- Xu J-R, Hamer JE, 1990. MAP Kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes & Development* 10: 2696–2706; <http://doi.org/10.1101/gad.10.21.2696>.
- Xu J-R, Staiger CJ, Hamer JE, 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12713–12718; <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12713>.
- Xue C, Park G, Choi W, Zheng L, Dean RA, Xu J-R, 2002. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. *The Plant cell* 14: 2107–2119; <https://doi.org/10.1105/tpc.003426>.

- 横山 綾, 2013. ウリ類炭疽病菌の病原性欠損変異株の解析 滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科卒業論文 pp.1-27.
- 横山 綾, 2015. ウリ類炭疽病菌におけるホメオボックス転写因子の機能解析 滋賀県立大学大学院環境科学研究科環境動態学専攻修士論文 pp.1-54.
- Yokoyama A, Izumitsu K, Sumita T, Tanaka C, Irie T, Suzuki K, 2018. Homeobox transcription factor CoHox3 is essential for appressorium formation in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Mycoscience* 59: 353–362; <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.02.001>.
- Yokoyama A, Izumitsu K, Irie T, Suzuki K, 2019. The homeobox transcription factor CoHox1 is required for the morphogenesis of infection hyphae in host plants and pathogenicity in *Colletotrichum orbiculare*. *Mycoscience* 60: 110–115; <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.11.001>.
- Zheng W, Zhao X, Xie Q, Huang Q, Zhang C, Zhai H, Xu L, Lu G, Shim W-B and Wang Z, 2012. A conserved homeobox transcription factor Htf1 is required for phialide development and conidiogenesis in *Fusarium* species. *PLoS ONE* 7: e45432; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045432>.
- Zhu B, Cai G, Hall EO, Freeman GJ, 2007. In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques* 43: 354–359; <https://doi.org/10.2144/000112536>.

謝辞

本研究に際して様々なご指導を頂きました、滋賀県立大学環境科学部生物資源管理学科の鈴木一実教授、入江俊一准教授ならびに泉津弘佑講師に深謝いたします。また、ウリ類炭疽病菌のゲノム情報を提供して下さった京都府立大学の久保康之教授、AtMT 法による形質転換株の作出についてご教授くださった辻 元人講師、蛍光顕微鏡をお借りした滋賀県立大学環境科学部環境生態学科の伴 修平教授、GPD1-pro-eGFP および pZBchH2B-mCherry を提供して下さった京都大学微生物環境制御学研究室の田中千尋教授および住田卓也さんにお礼を申し上げます。また、共にホメオボックスの研究を行った小幡善也さん、犬丸仁志さん、丹羽亜由美さん、森 瑞希さん、中山吉蔵さん、そして、研究に協力して下さった微生物グループの皆様に感謝いたします。

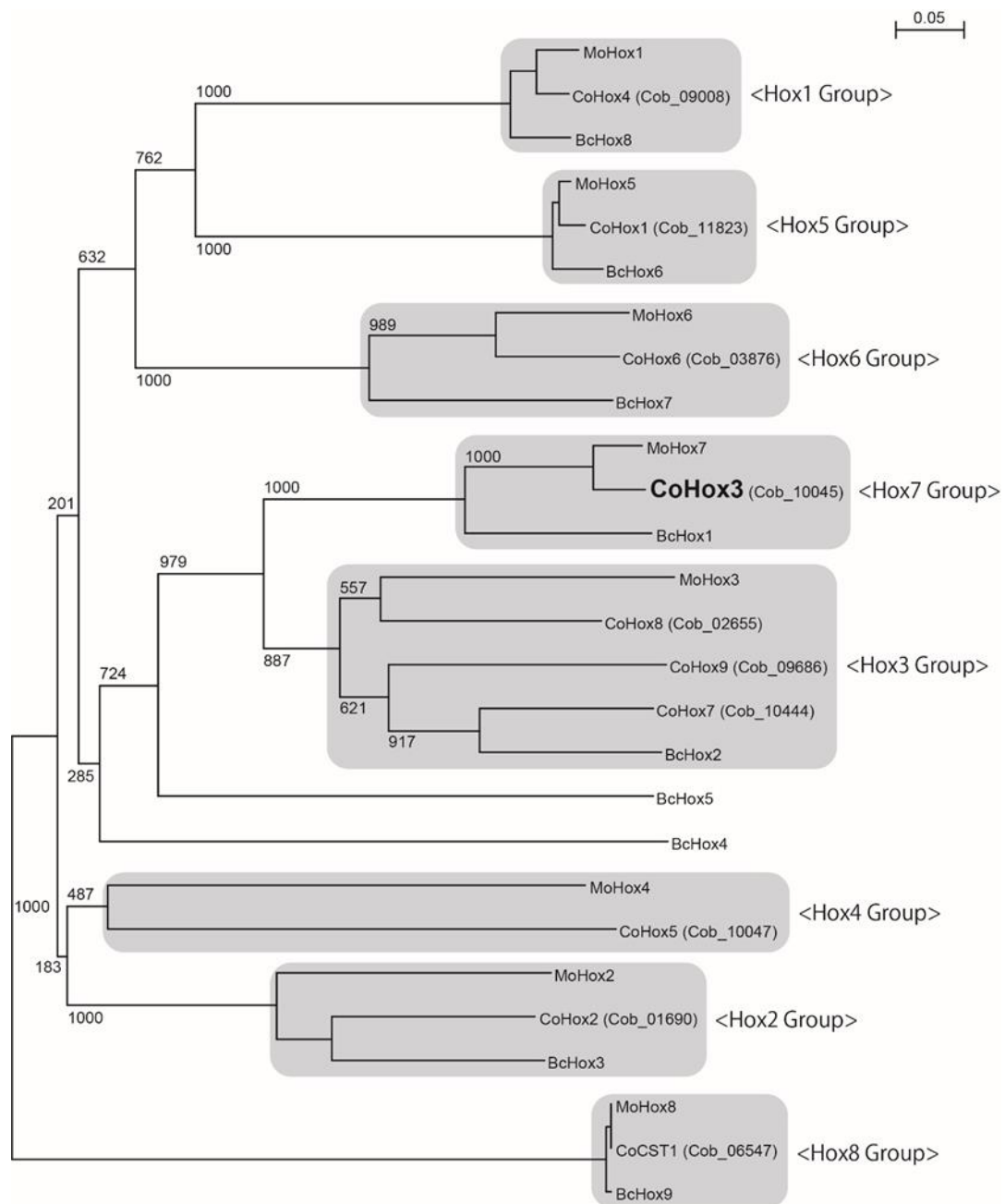


図1 *Colletotrichum orbiculare* と他の菌における推定ホメオボックス転写因子
C. orbiculare、*Magnaporthe oryzae* および *Botrytis cinerea* のホメオボックス遺伝子の系
 統樹 (Unrooted neighbor-joining tree)。保存されたホメオボックスドメイン (IPR009057,
 IPR001356, IPR003120) アミノ酸配列は ClustalW を用いてアライメントした。ブートス
 トラップ値は 1,000 反復から得た。

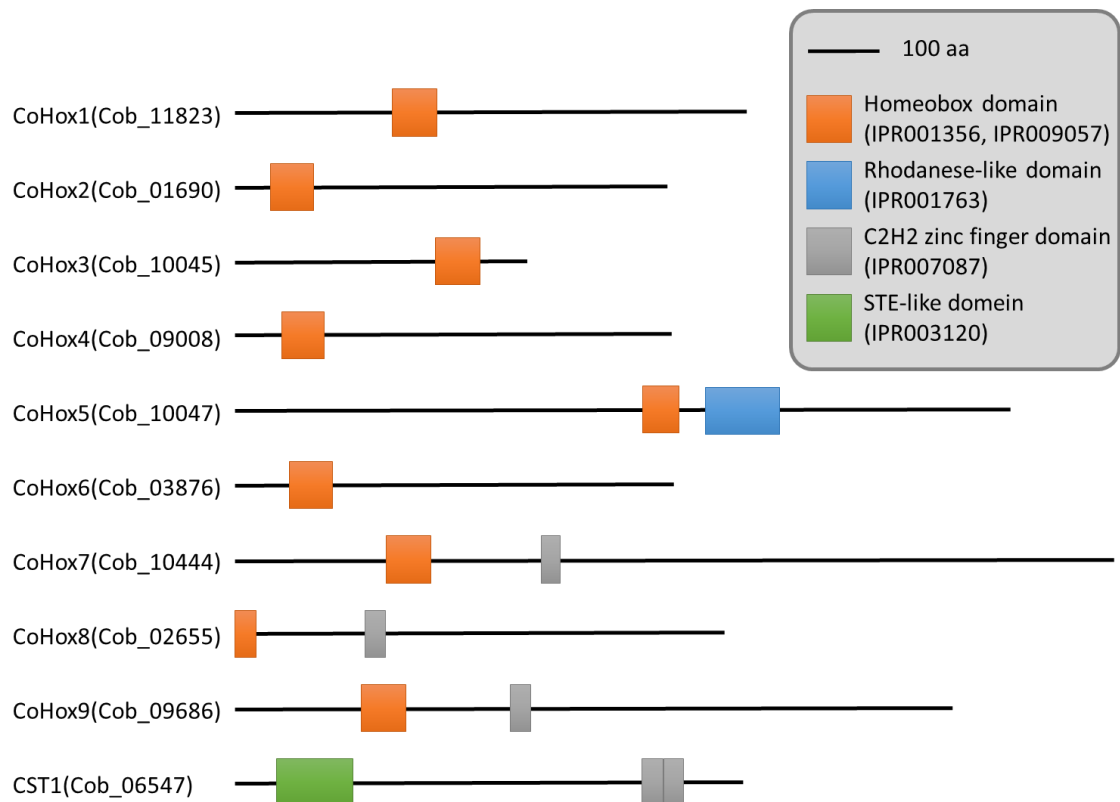


図2 *C. orbiculare* のホメオボックス遺伝子のドメイン

黒線は *C. orbiculare* のホメオボックス遺伝子のアミノ酸配列を示している。ボックスは *C. orbiculare* のホメオボックス遺伝子におけるホメオボックスドメイン (IPR00135 および IPR009057)、ロタネーゼ様ドメイン (IPR001763)、C₂H₂ ジンクフィンガードメイン (IPR0070087) および STE 様ドメイン (IPR003120) の位置を示している。これらのドメインは InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いて同定した。

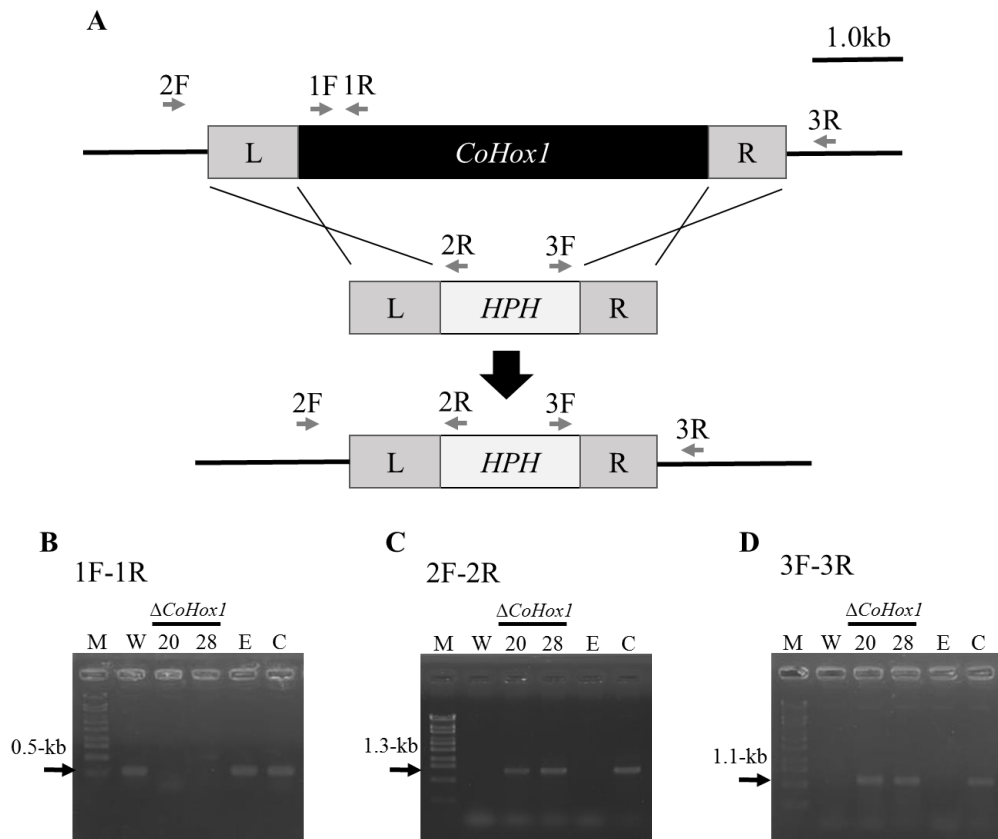


図3 *C. orbiculare*における *CoHox1* の遺伝子破壊

A: *CoHox1* の遺伝子置換。HPH はハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを示している。
 B-D: *CoHox1* 破壊の PCR 解析。B から D はそれぞれ 1F-1R、2F-2R および 3F-3R プライマーペアを用いた PCR の結果を示している。M、 λ DNA ラダー；W、野生株 104-T 株； $\Delta CoHox1$ 、*CoHox1* 遺伝子破壊株；E、エクトピック株；C、*CoHox1* 相補株。

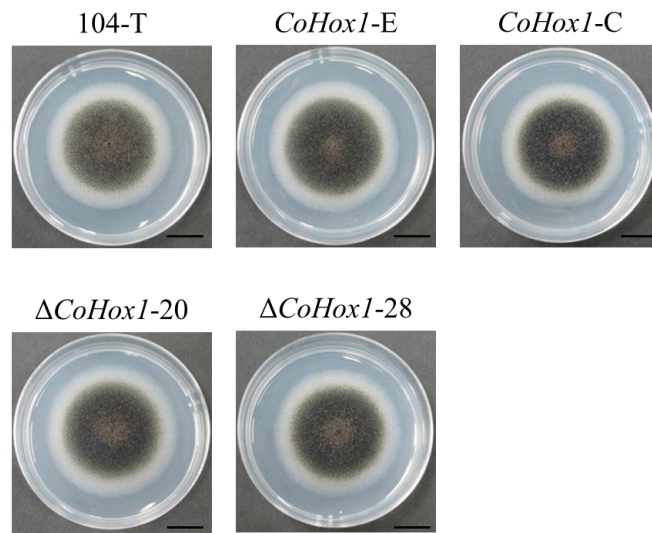


図4 *CoHox1* 遺伝子破壊株のコロニー形成

野生株 104-T 株、*CoHox1* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox1-20$ および $\Delta CoHox1-28$)、エクトピック株 (*CoHox1-E*) および *CoHox1* 遺伝子相補株 (*CoHox1-C*) を PDA 培地上で 24 °C 7 日間培養した。スケールバーは 10 mm。

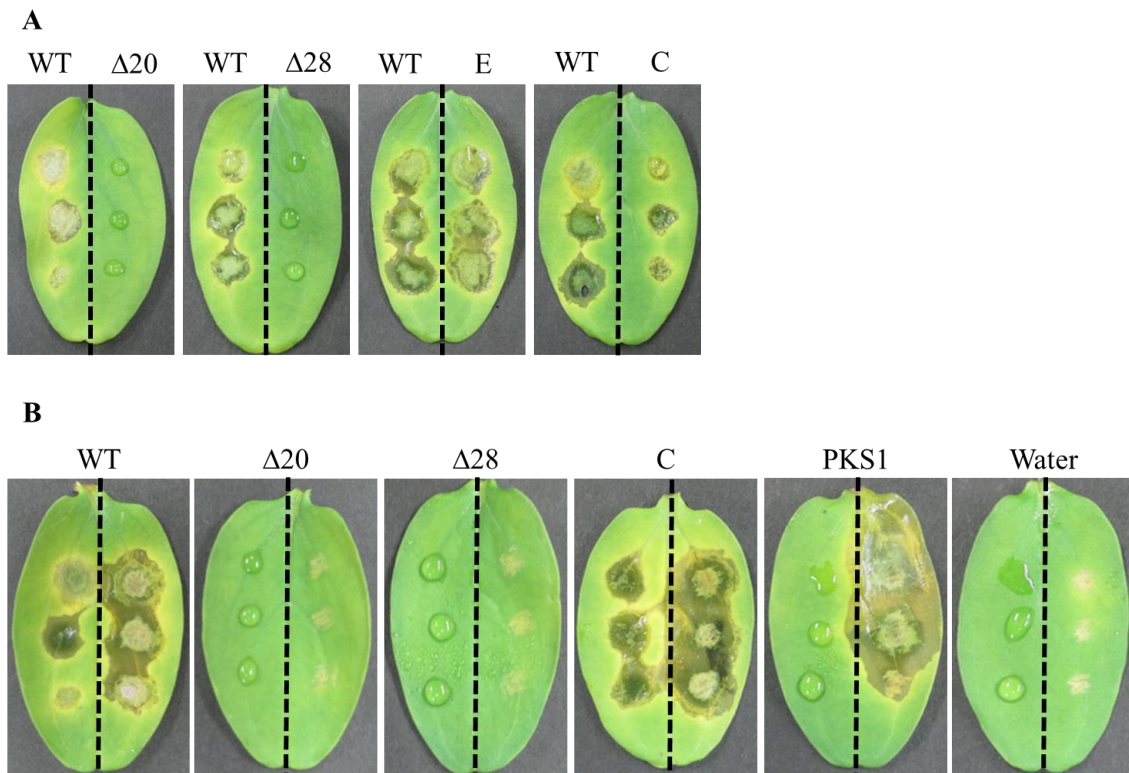


図 5 *CoHox1* 遺伝子破壊株の病原性解析

A: 無傷の切り取ったキュウリ子葉上で培養 7 日後の各菌株の病斑形成。子葉の左側には野生株 104-T 株の孢子懸濁液を接種し、右側には *CoHox1* 破壊株 ($\Delta 20$ 、 $\Delta 28$)、エクトピック株 (E) もしくは *CoHox1* 相補株 (C) の孢子懸濁液を接種した。B: 傷をつけたキュウリ子葉上で培養 7 日後の各菌株の病斑形成。子葉の右側にはつまようじで傷をつけ、左側には傷をつけず、野生株 104-T 株、*CoHox1* 破壊株 ($\Delta 20$ 、 $\Delta 28$)、エクトピック株 (E)、*CoHox1* 相補株 (C)、*PKS1* 遺伝子破壊株 (PKS1) の孢子懸濁液およびネガティブコントロールの滅菌水 (Water) を接種した。

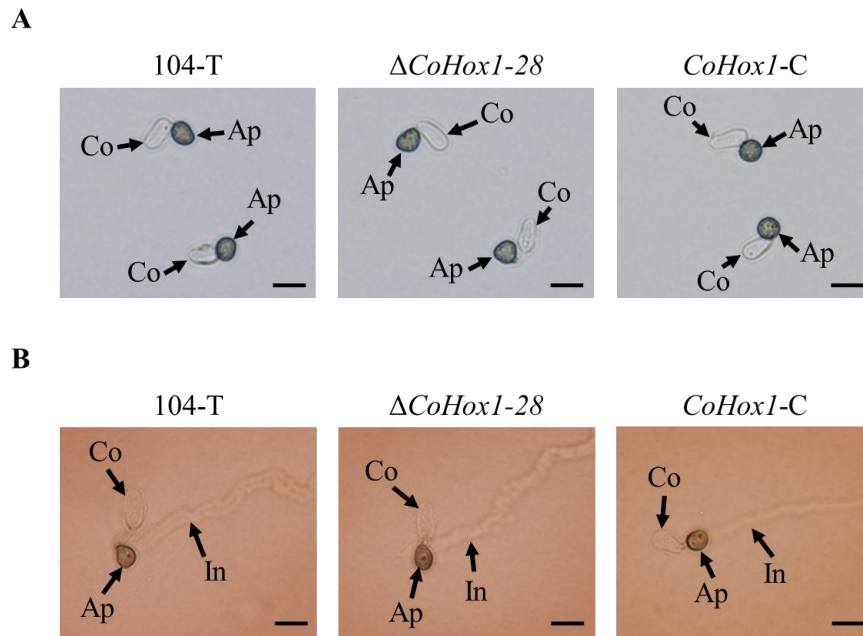


図6 ガラスおよび人工セルロース膜上での *CoHox1* 遺伝子破壊株の形態分化

A: ガラス面上での野生株 104-T 株、*CoHox1* 破壊株 ($\Delta CoHox1-28$) もしくは *CoHox1* 相補株 (*CoHox1-C*) の付着器形成。各菌株の孢子懸濁液を接種 24 時間後に観察した。B: 人工セルロース膜上での野生株 104-T 株、*CoHox1* 破壊株 ($\Delta CoHox1-28$) もしくは *CoHox1* 相補株 (*CoHox1-C*) の付着器および侵入菌糸形成。各菌株の孢子懸濁液を接種 48 時間後にセルロース染色液で染色して観察した。Co、分生孢子; Ap、付着器; In、侵入菌糸。スケールバーは 10 μm 。

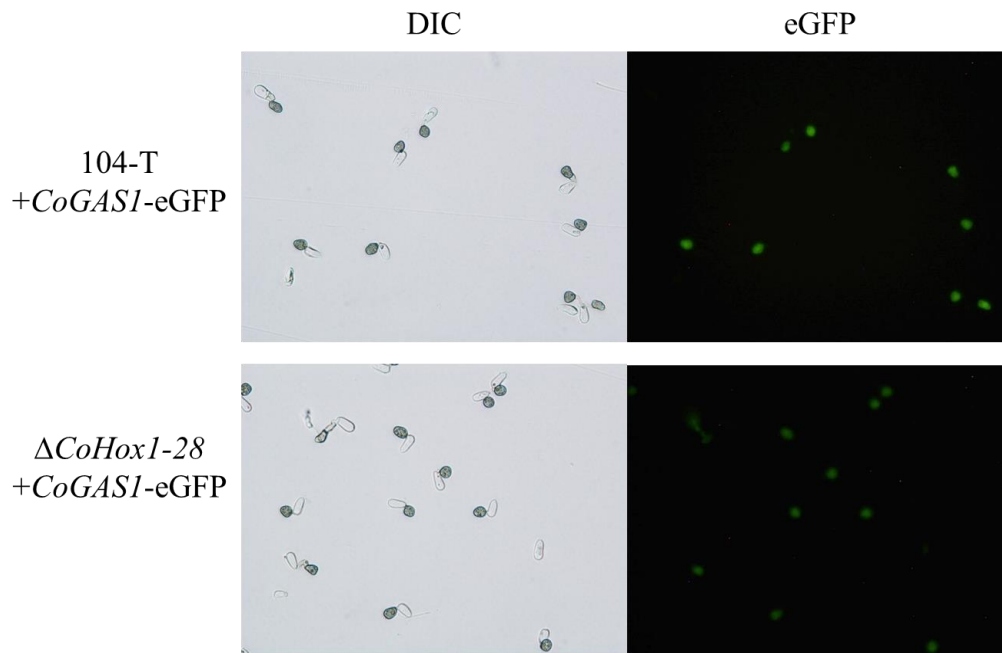


図7 付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* を用いた *CoHox1* 遺伝子破壊株の付着器形成
CoGAS1 プロモーター-eGFP 融合遺伝子を導入した野生株 104-T 株および *CoHox1* 遺伝子破壊株 (Δ *CoHox1*-28) の孢子懸濁液を 24 °C で 24 時間培養した。各菌株の eGFP 蛍光について蛍光顕微鏡を用いて観察した。

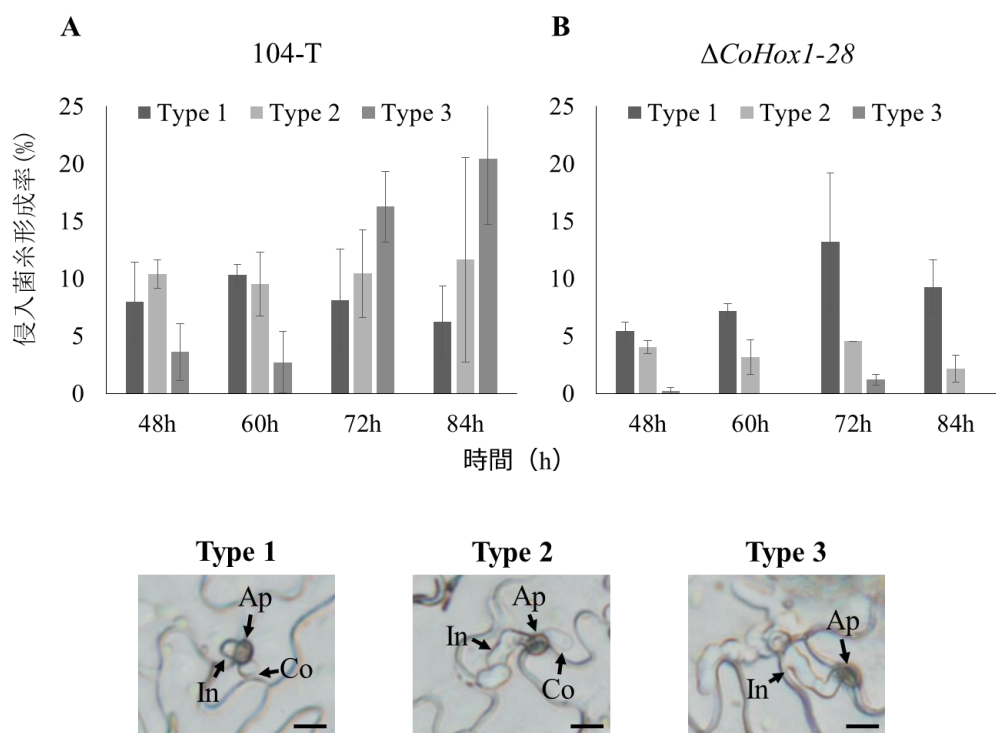


図8 宿主キュウリ子葉上での *CoHox1* 遺伝子破壊株の侵入菌糸形成

野生株 104-T 株および *CoHox1* 遺伝子破壊株の分生胞子をキュウリ子葉に接種後 24 °C で培養し、培養 48 時間から 84 時間まで 12 時間ごとに観察し、侵入菌糸を 3 つのタイプに分けて測定した。Type 1、侵入直後の侵入菌糸；Type 2、侵入した宿主細胞内で伸長する侵入菌糸；Type 3、侵入した宿主細胞に隣接する細胞へ伸展した侵入菌糸。Co、分生胞子；Ap、付着器；In、侵入菌糸。エラーバーは標準偏差を示す。スケールバーは 10 μm 。

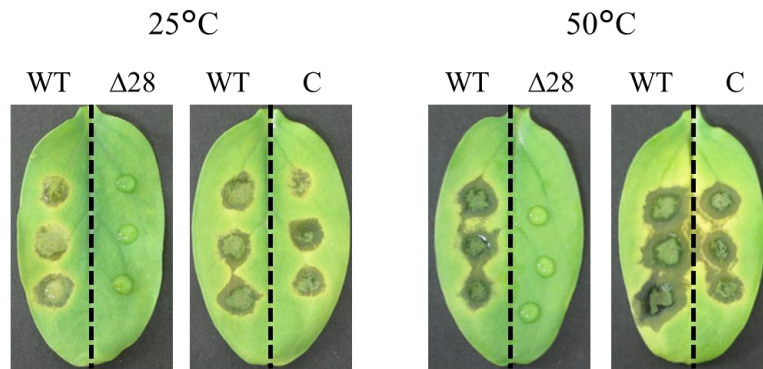


図9 熱処理した子葉上での *CoHox1* 遺伝子破壊株の病原性解析

キュウリ子葉を 25 °C の水（コントロール）もしくは 50 °C の温湯で 30 秒間熱処理した。野生株 104-T 株の孢子懸濁液を葉の左側に、*CoHox1* 遺伝子破壊株 ($\Delta 28$) および *CoHox1* 相補株 (C) の孢子懸濁液を葉の右側に接種し 24 °C で 7 日間培養した。

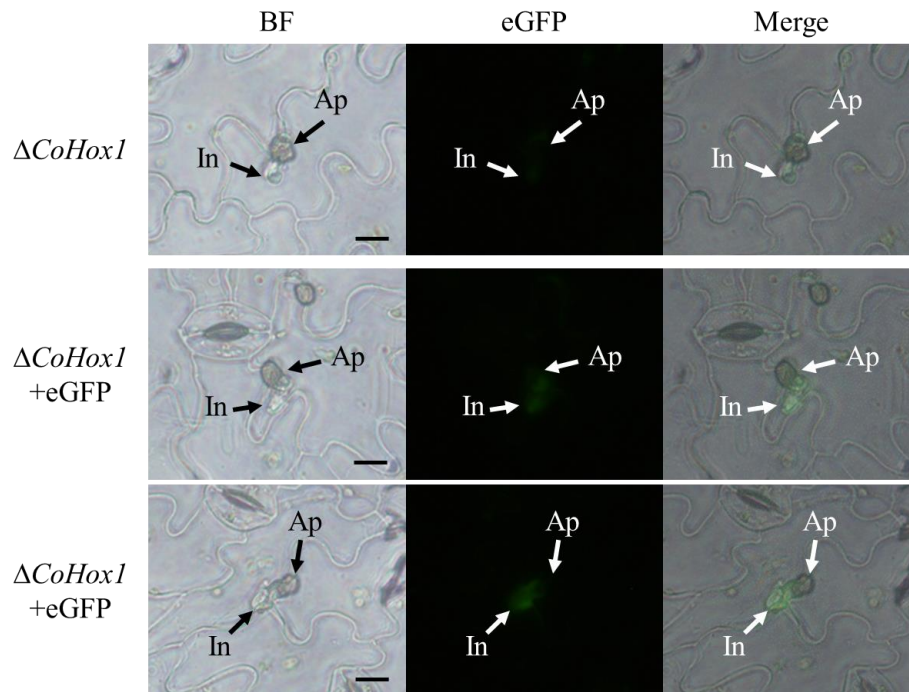


図 10 蛍光タンパク質 eGFP を用いた長期培養時の宿主内での生存
GPD1 プロモーターに eGFP を融合した遺伝子を導入した *CoHox1* 破壊株の分生胞子をキュウリ子葉に接種して 24 °C で 19 日間培養し、蛍光顕微鏡で eGFP 蛍光を観察した。Ap、付着器；In、侵入菌糸。バーは 10 μ m。

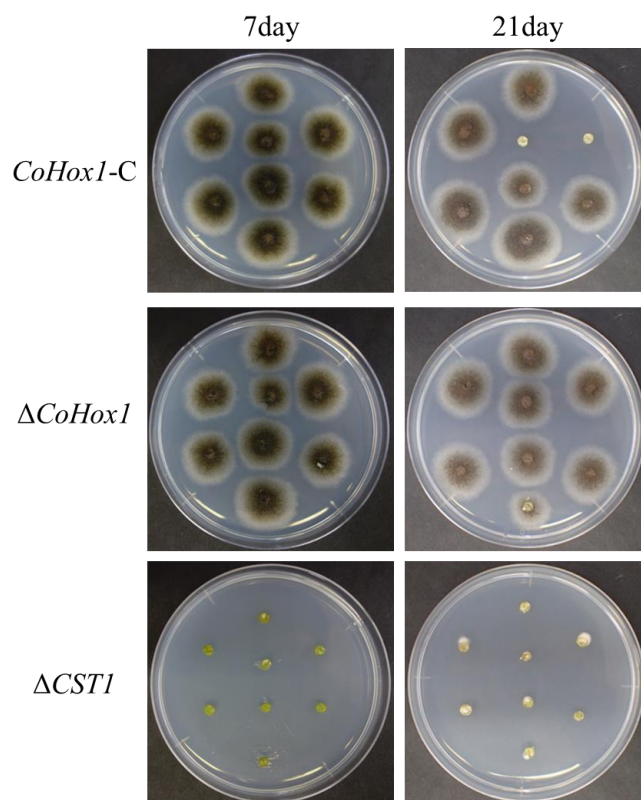


図 11 分離法を用いた長期培養時の宿主内での生存

CoHox1 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox1$)、ポジティブコントロールの *CoHox1* 遺伝子相補株

(*CoHox1-C*) およびネガティブコントロールの *CST1* 遺伝子破壊株 ($\Delta CST1$) の孢子懸濁液を宿主葉に接種し、7日および21日培養後に接種葉の表面を次亜塩素酸ナトリウム 10% で消毒後に滅菌水で洗浄し、コルクボーラで打ち抜いた。*CoHox1* 遺伝子破壊株と *CoHox1* 相補株はハイグロマイシンおよびストレプトマイシンを、*CST1* 遺伝子破壊株はジェネティシンとストレプトマイシンを添加した培地に打ち抜いたディスクを置き、7日間 24°C で培養した。

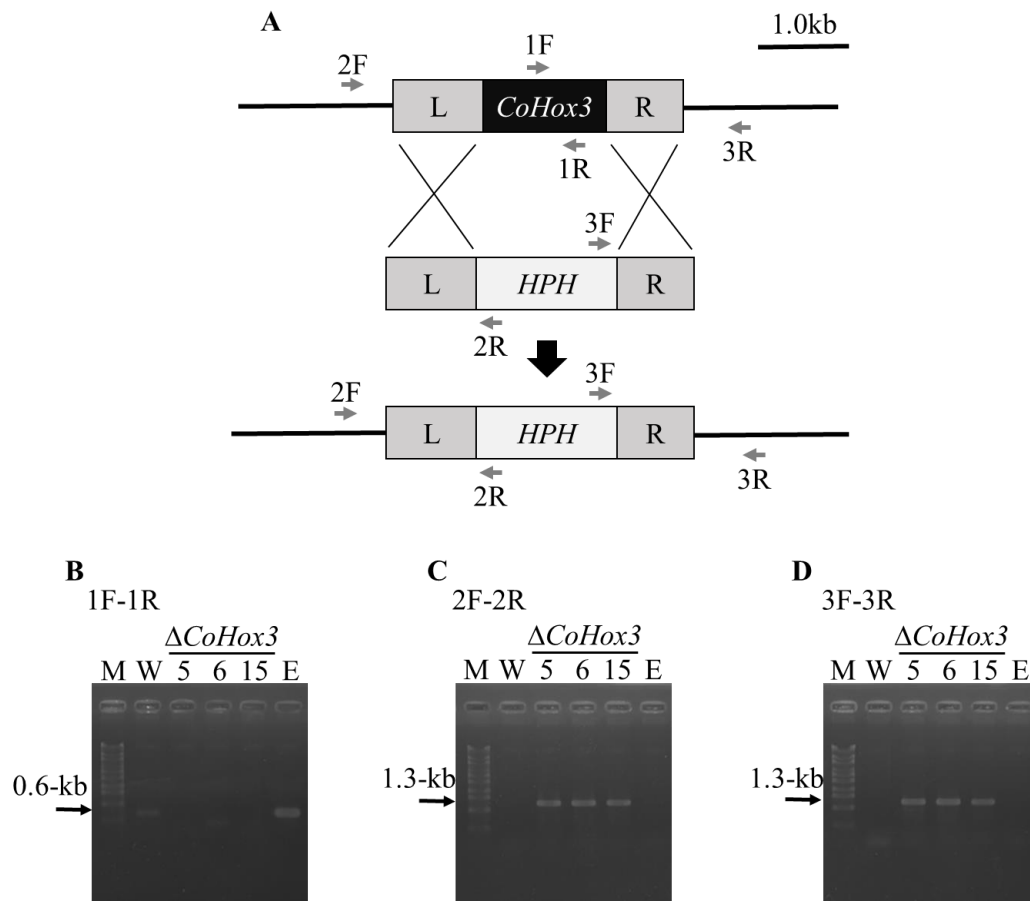


図 12 *C. orbiculare* における *CoHox3* の遺伝子破壊

A : *CoHox3* の遺伝子置換。HPH : ハイグロマイシン耐性遺伝子カセット。B-D : *CoHox3* 破壊の PCR 解析。B から D はそれぞれ 1F-1R、2F-2R および 3F-3R プライマーペアを用いた PCR の結果。M、1-kb DNA ラダー ; W、野生株 104-T 株 ; $\Delta CoHox3$ 、*CoHox3* 遺伝子破壊株 ; E、エクトピック株。

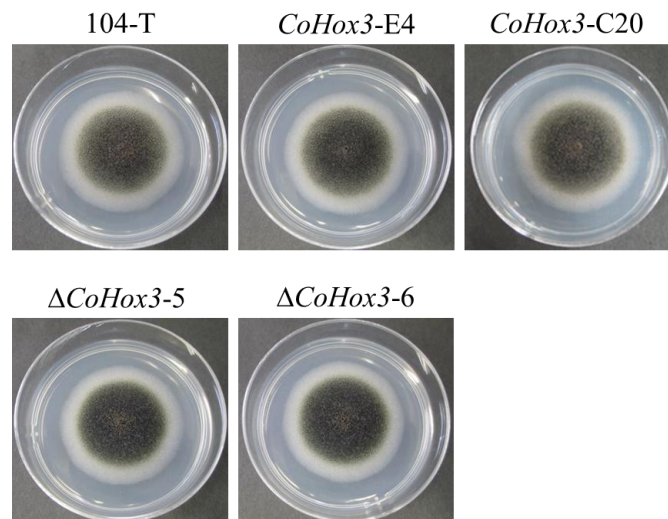


図 13 *CoHox3* 遺伝子破壊株のコロニー形成

野生株 104-T 株、*CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3-5$ および $\Delta CoHox3-6$)、エクトピック株 (*CoHox3-E4*) および *CoHox3* 遺伝子相補株 (*CoHox3-C20*) を PDA 培地上で 24 °C 7 日間培養した。スケールバーは 10 mm。

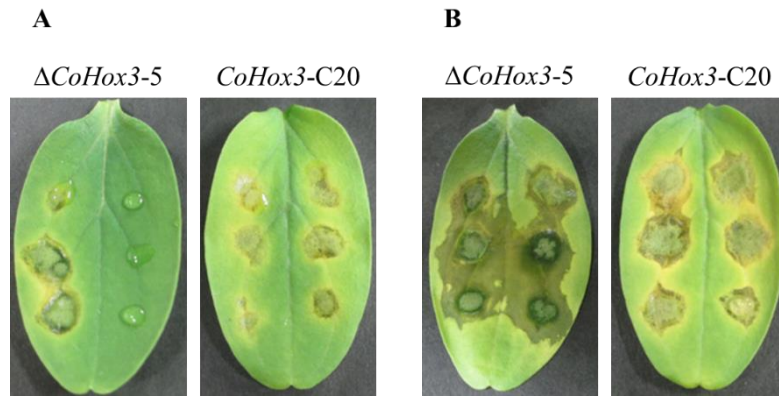


図 14 *CoHox3*破壊株の病原性解析

A と B はキュウリ子葉上に各菌株の孢子懸濁液を接種し 7 日間培養した後の病斑形成を示している。子葉の左側に野生株 104-T 株の孢子懸濁液を接種し、右側に *CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3-5$) もしくは *CoHox3* 相補株 (*CoHox3-C20*) を接種した。各菌株の孢子懸濁液の孢子濃度を 1×10^4 孢子/mL (A) もしくは 1×10^6 孢子/mL (B) とした。

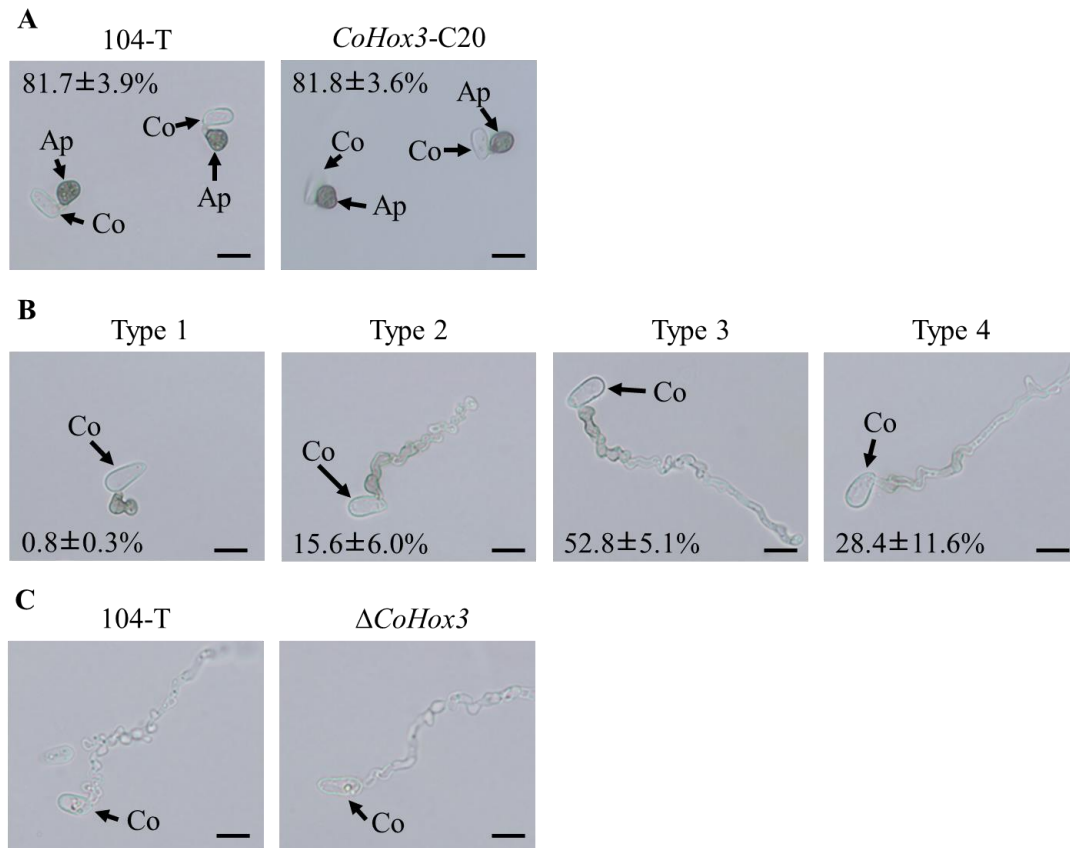


図 15 *CoHox3* 遺伝子破壊株の胞子発芽

野生株 104-T 株、*CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3$ -5) および *CoHox3* 相補株 (*CoHox3*-C20) の胞子懸濁液をガラス面上にて 24 °C で 24 時間培養した。A : 野生株 104-T 株および *CoHox3*-C20 株の付着器形成。黒字はそれぞれの菌株の付着器形成率を示す。B : *CoHox3* 遺伝子破壊株の胞子発芽形態のタイプ分け。Type 1、薄いメラニン化を伴う付着器様構造を形成した発芽胞子 ; Type 2、薄いメラニン化を伴う付着器様構造および伸長した菌糸を形成した発芽胞子 ; Type 3、薄いメラニン化を伴う伸長した菌糸を形成した発芽胞子 ; Type 4、メラニン化を伴わない伸長した菌糸を形成した発芽胞子。黒字は *CoHox3* 遺伝子破壊株の各タイプの割合を示す。C : 0.5 M スクロース溶液で培養した野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3$) の発芽胞子。Co、発芽胞子 ; Ap、付着器。スケールバーは 10 μm 。

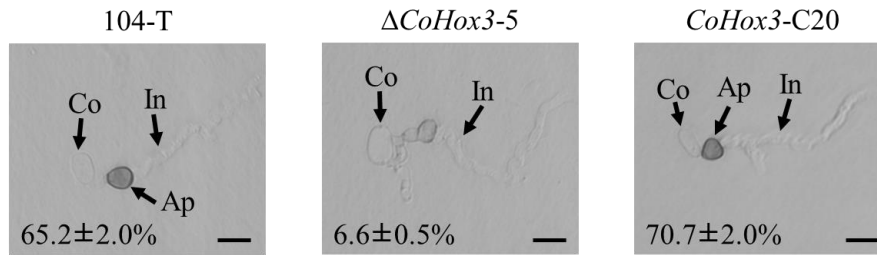


図 16 人工セルロース膜上での *CoHox3* 遺伝子破壊株の侵入
 野生株 104-T 株、*CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3-5$) および *CoHox3* 相補株 (*CoHox3-C20*) の孢子懸濁液をセルロース膜上に接種して 24 °C で 48 時間培養した。黒字は各菌株の侵入菌糸形成率を示す。Co、分生孢子 ; Ap、付着器 ; In、侵入菌糸。スケールバーは 10 μm 。

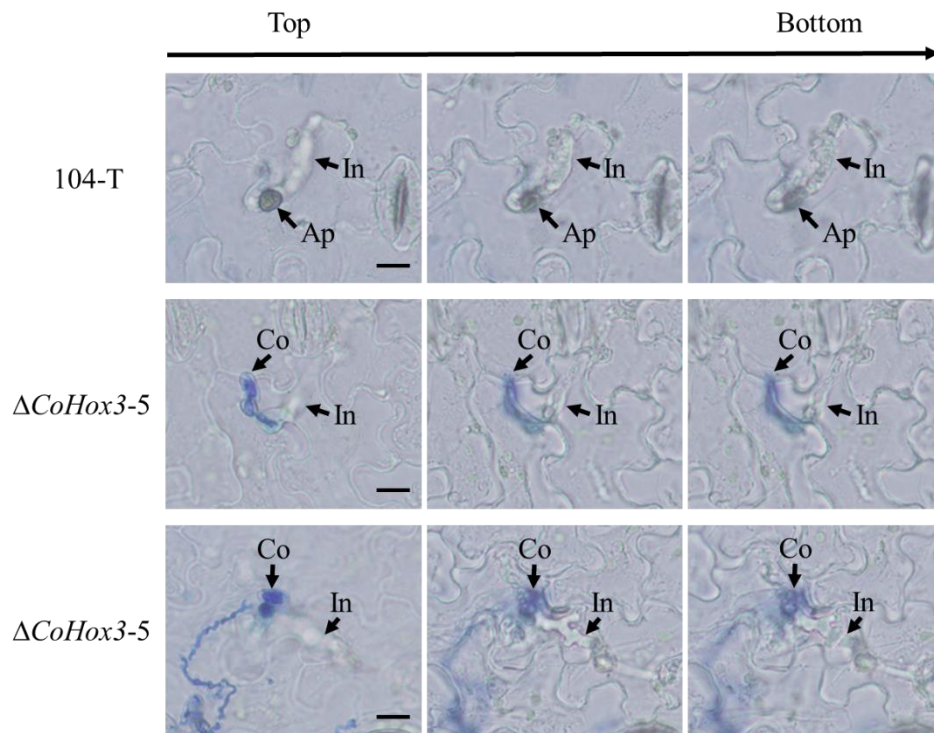


図 17 宿主葉内での *CoHox3* 遺伝子破壊株の侵入菌糸

野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3-5$) の孢子懸濁液 (1×10^5 孢子/mL) をキュウリ子葉に接種し、 24°C で 72 時間培養した。侵入菌糸を除く孢子および菌糸をラクトフェノールコットンブルーで染色した。写真上部の矢印は植物表面 (Top) から植物細胞内部 (Bottom) へ顕微鏡のピントが移行していることを示している。Co、分生孢子；Ap、付着器；In、侵入菌糸。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

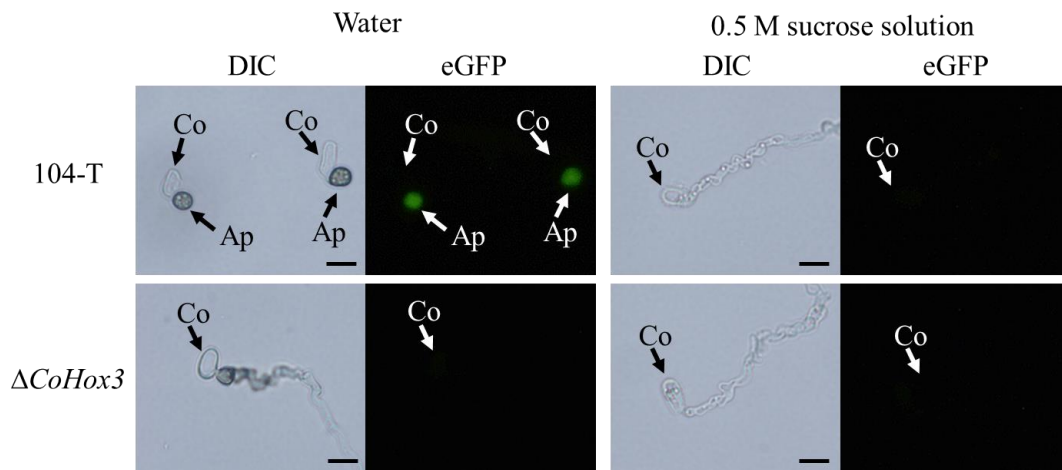


図 18 *CoHox3* 遺伝子破壊株の発芽胞子における付着器特異的遺伝子 *CoGAS1* の発現
CoGAS1 プロモーター-eGFP 融合遺伝子を導入した野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3$) の胞子懸濁液を滅菌水もしくは 0.5 M スクロース溶液で調整し、24 °C で 24 時間培養した。各菌株の eGFP 蛍光について蛍光顕微鏡を用いて観察した。Co、分生胞子；Ap、付着器。スケールバーは 10 μm 。

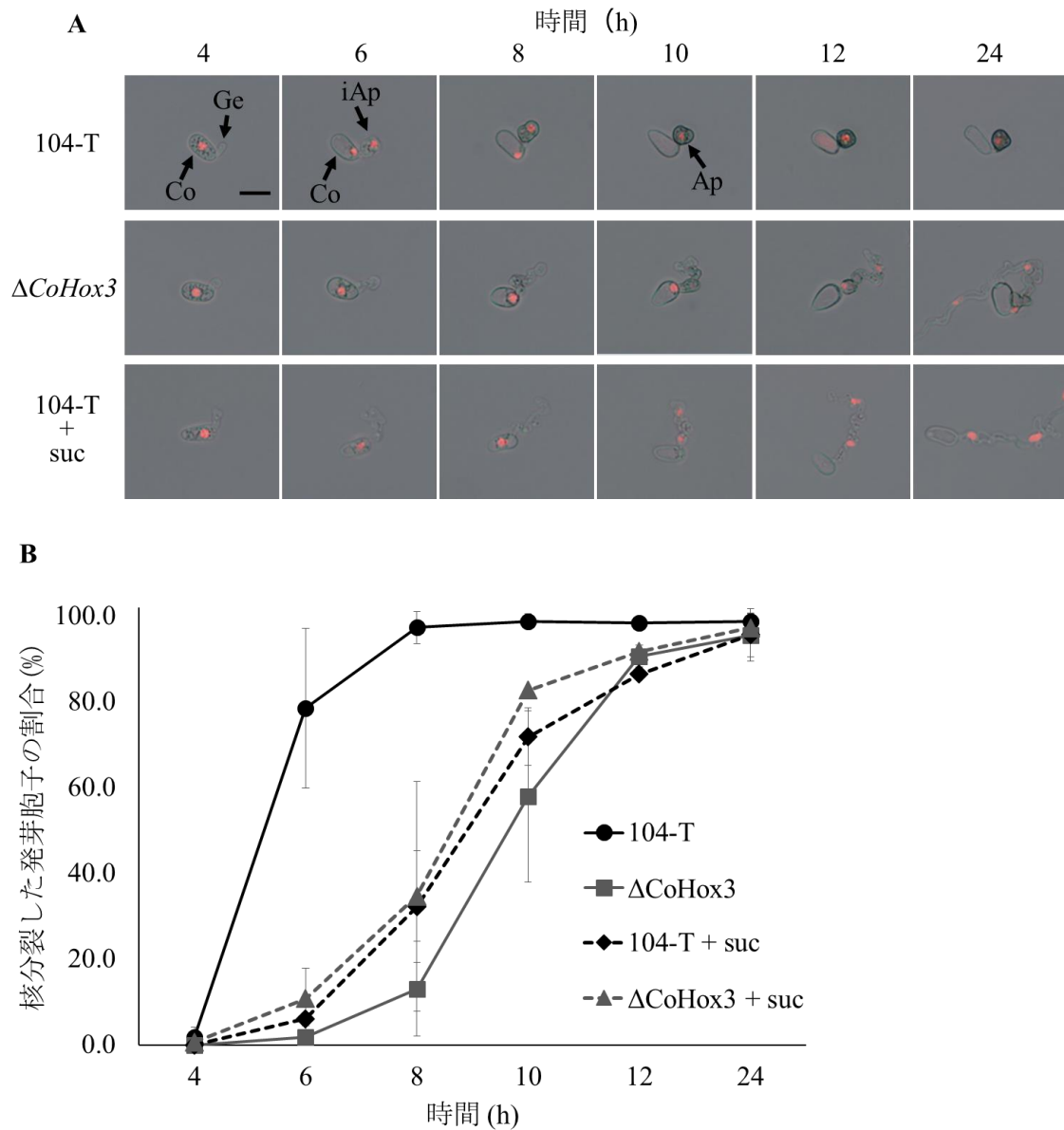


図 19 胞子発芽時における *CoHox3* 遺伝子破壊株の核分裂

A: *H2B-mCherry* 融合遺伝子を導入した野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株の胞子懸濁液を滅菌水もしくは 0.5 M スクロース溶液で調整し、24 °C で培養した。培養 4、6、8、10、12、24 時間ごとに蛍光顕微鏡で観察した。Co、分生胞子；Ge、発芽管；iAp、未熟付着器；Ap、付着器。バーは 10 μ m。B：胞子発芽時の各菌株の核分裂の割合。エラーバーは標準偏差を示す。

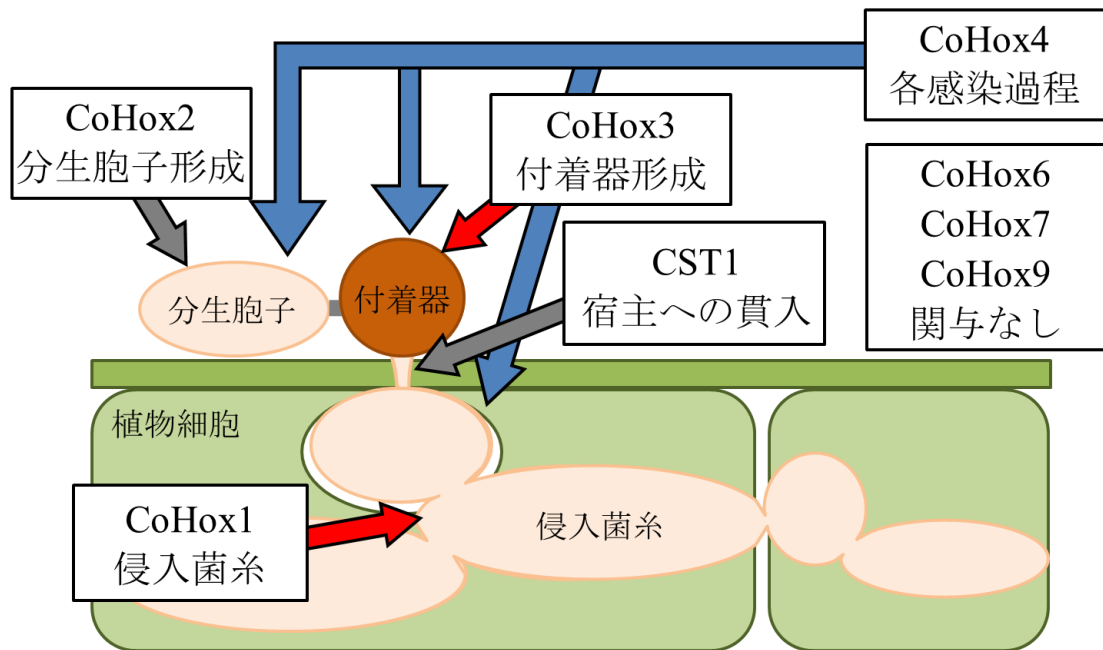


図 20 *C. orbiculare* の感染過程におけるホメオボックス転写因子の役割のモデル図
C. orbiculare のホメオボックス転写因子 CoHox1 は侵入菌糸の形態形成、CoHox2 は分生胞子形成、CoHox3 は付着器形成、CoHox4 は感染の各段階、CST1 は貫穿糸形成にそれぞれ関与する。また、CoHox6、CoHox7 および CoHox9 はウリ類炭疽病菌の感染過程に関与しない。

表 1 病原性欠損変異株と同定した変異遺伝子の機能

菌株	同定した変異遺伝子の機能
Path-1	enoyl-CoA hydratase
Path-2	topoisomerase II-associated protein PAT1
Path-3	Function unknown
Path-4	Unidentified
Path-5	secreted endo-beta-galactanase
Path-6	Unidentified
Path-7	Function unknown
Path-8	C6 finger domain-containing protein
Path-9	homeobox transcription factor
Path-10	upf0136 domain protein
Path-11	low affinity cAMP phosphodiesterase
Path-12	cation diffusion facilitator
Path-13	ATP synthase delta subunit
Path-14	hypothetical protein CGLO_14080

表 2 CoHox1 の解析に用いたプライマー

プライマー名	配列
dis-CoHox1-LF	CTCGTCTCATTCGACCTGGTCCTG
dis-CoHox1-LR	CTGAGCAAACCTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCAC TGGTCGGGAGGATGGGCGTTGTTG
dis-CoHox1-RF	GATCAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG AACCTTGTGCGCCTGGCCGAAG
dis-CoHox1-RR	AGCTTGTACACATCGACCGCATCTC
HPH-F	GTGCTTCTCAAATGCCTGAG
HPH-R	CGAAGAACGTTTTCCAATG
chk-CoHox1-INF (1F)	AGCACCTTCTCGCAGACGTATGAG
chk-CoHox1-INR (1R)	TTCATCTTTCTACGGGCAGCCGTC
chk-CoHox1-LF (2F)	CTTCACTTCTCTTCGACACCACAGC
chk-CoHox1-LR (2R)	TGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGG
chk-CoHox1-RF (3F)	GTTGCCTAAATGAACCATCTTGTC
chk-CoHox1-RR (3R)	GGCAGACGAGAGCCAAAAGTTGTGC
eGFP-F	AGCTTTTGCCCATGACGGCGG
eGFP-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

表 3 CoHox3 の解析に用いたプライマー

プライマー名	配列
dis-CoHox3-LF	CAAGGCATTAAGCATCCGAGGGCTG
dis-CoHox3-LR	CTGAGCAAACCTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCACGACCGT GGCGGATGGAGCAGTG
dis-CoHox3-RF	GATCAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGAACGA CGCACTACGATCGGGAGC
dis-CoHox3-RR	GGACGCGGCTTGTCTACACAGAG
HPH-F	GTGCTTCTCAAATGCCTGAG
HPH-R	CGAAGAACGTTTTCCAATG
chk-CoHox3-INF (1F)	CCTTACATGTCCACGTCTGGCAT
chk-CoHox3-INR (1R)	GCGAAAACATTAGCCTTTGACCG
chk-CoHox3-LF (2F)	AGACAGACAAGAGTATCCGCAGAG
chk-CoHox3-RR (3R)	AGTTAGTGCAAACCTCTTCCTCG
chk-HPH-F (2R)	TGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGG
chk-HPH-R (3F)	GTTGCCTAAATGAACCATCTTGTC
CoGAS1p-inf-F	TGGAATTCTGCAGATATGACGAAGTTTGCCCTGGCGTACC
CoGAS1p-inf-R	GCCCTTGCTCACCATTTTTGACTAAAGGTGAGTTGAAG
eGFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG
eGFP-inf-R	GCCAGTGTGATGGATTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
comp-CoHox3-F	TGGAATTCTGCAGATCCTCCAACCCGCCCAAACAATGC
comp-CoHox3-R	GCCAGTGTGATGGATGGATGGACGCGGCTTGTCTACACA GAG
CtmCherry-F	GATATCATTTAAATGGTGGTGGTGGTGGTATGGTGAGCAA GGGCGAGG
mCherry-R	CTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
BchH2B-prom-F	TGAACACGACCAACTGGGAATGC
BchH2B-mCherry-R	TTCGTGGATGAAGAGTACTTGGTAAC

表 4 *CoHox1* 遺伝子破壊株の菌そう直径および分生孢子形成数

菌株	菌そう直径 (mm)	分生孢子形成数 (10 ⁶ 分生孢子/菌そう)
104-T	36.3 ± 0.3 ^a	39.8 ± 8.8 ^a
$\Delta CoHox1-20$	37.7 ± 0.4 ^b	36.6 ± 5.6 ^a
$\Delta CoHox1-28$	36.6 ± 0.5 ^a	30.8 ± 3.2 ^a
<i>CoHox1-E</i>	36.7 ± 0.4 ^a	31.9 ± 10.6 ^a
<i>CoHox1-C</i>	36.2 ± 0.7 ^a	30.5 ± 5.0 ^a

*野生株 104-T 株、*CoHox1* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox1-20$ および $\Delta CoHox1-28$)、*CoHox1* エクトピック株 (*CoHox1-E*) および *CoHox1* 相補株 (*CoHox1-C*) を PDA 培地上で 7 日間 24 °C 培養し、菌そう直径と分生孢子形成数を測定した。各菌株とも 5 つの菌そうを測定し、その平均値と標準偏差を算出した。

**アルファベットは項目ごとに Tukey-Kramer 法 ($p < 0.01$) によって得られた有意差を示す。

表 5 ガラスおよび人工セルロース膜上での *CoHox1* 遺伝子破壊株の形態形成

菌株	ガラス	人工セルロース膜	
	付着器形成率 (%)	付着器形成率 (%)	侵入菌糸形成率 (%)
104-T	89.3 ± 6.0 ^a	68.2 ± 8.8 ^a	60.7 ± 9.0 ^a
$\Delta CoHox1-20$	89.9 ± 1.7 ^a	71.4 ± 6.3 ^a	51.9 ± 6.3 ^a
$\Delta CoHox1-28$	90.3 ± 3.1 ^a	67.7 ± 3.3 ^a	50.8 ± 3.7 ^a
<i>CoHox1-E</i>	88.7 ± 3.0 ^a	63.5 ± 5.9 ^a	54.1 ± 7.6 ^a
<i>CoHox1-C</i>	86.3 ± 4.8 ^a	59.8 ± 9.1 ^a	51.3 ± 8.4 ^a

*野生株 104-T 株、*CoHox1* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox1-20$ および $\Delta CoHox1-28$)、*CoHox1* エクトピック株 (*CoHox1-E*) および *CoHox1* 相補株の孢子懸濁液をガラススライドもしくは人工セルロース膜上に接種し、それぞれ 24 時間もしくは 48 時間 24 °C で培養後、付着器形成率 (%) および侵入菌糸形成率 (%) を測定した。各サンプルにおいて、少なくとも 100 個の分生胞子の観察を 6 反復行い、平均値と標準偏差を算出した。

**アルファベットは項目ごとに Tukey-Kramer 法 ($p < 0.01$) によって得られた有意差を示す。

表 6 分離法を用いた長期培養時の宿主内での *CoHox1* 遺伝子破壊株の生存

菌株	1 日	3 日	5 日	7 日	14 日	21 日
<i>ΔCoHox1</i>	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
	8/8	8/8	8/8	8/8	7/7	7/8
<i>CoHox1-C</i>	8/8	8/8	8/8	8/8	3/7	6/8
	8/8	8/8	8/8	8/8	5/7	7/8
<i>ΔCST1</i>	2/8	3/8	1/7	0/8	0/8	0/8
	4/8	5/8	4/8	0/8	0/8	0/8

*各菌株の孢子懸濁液 1.0×10^5 分生孢子/mL を宿主キュウリ本葉へ接種し、1 日、3 日、5 日、7 日、14 日もしくは 21 日培養後にコルクボーラーにて打ち抜き、次亜塩素酸ナトリウム 10% で 1 分表面消毒を行い、滅菌水で洗浄後に、薬剤添加 PDA 培地上に置いて 24°C 7 日間培養した。各菌株とも培地にディスクを 8 つ置き、2 反復行った。薬剤は、*CoHox1* 遺伝子破壊株 (*ΔCoHox1*) および *CoHox1* 相補株 (*CoHox1-C*) にはストレプトマイシン 20ppm およびハイグロマイシン 100ppm を、*CST1* 遺伝子破壊株 (*ΔCST1*) にはストレプトマイシン 20ppm およびジェネティシン 100ppm を用いた。

表 7 *CoHox3* 遺伝子破壊株の菌そう直径および分生孢子形成

菌株	菌そう直径 (mm)	分生孢子形成数 (10^6 conidia/colony)
104-T	34.3 ± 0.4 ^a	32.2 ± 8.0 ^a
$\Delta CoHox3-5$	35.0 ± 0.4 ^a	20.5 ± 2.7 ^a
$\Delta CoHox3-6$	34.5 ± 0.3 ^a	19.9 ± 6.7 ^a
<i>CoHox3-E4</i>	35.5 ± 0.3 ^b	32.0 ± 8.2 ^a
<i>CoHox3-C20</i>	37.1 ± 0.3 ^c	25.1 ± 2.6 ^a

*野生株 104-T 株、*CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3-5$ および $\Delta CoHox3-6$)、*CoHox3* エクトピック株 (*CoHox3-E4*) および *CoHox3* 相補株 (*CoHox3-C20*) を PDA 培地上で 7 日間 24 °C 培養し、菌そう直径と分生孢子形成数を測定した。各菌株とも 5 つの菌そうを測定し、その平均値と標準偏差を算出した。

**アルファベットは項目ごとに Tukey-Kramer test ($p < 0.01$) によって算出した有意差を示している。

表 8 宿主葉内での *CoHox3* 遺伝子破壊株の侵入菌糸形成

菌株	発芽胞子数	侵入菌糸数	侵入菌糸形成率(%)
104-T	94	34	36.17
	104	38	36.54
	116	54	46.55
$\Delta CoHox3-5$	725	2	0.28
	1244	7	0.56
	1279	5	0.39

*野生株 104-T 株および *CoHox3* 遺伝子破壊株 ($\Delta CoHox3-5$) を PDA 培地上で 7 日間 24 °C 培養した。両菌株の胞子懸濁液を同じキュウリ子葉にドロップ接種し、培養 72 時間後にドロップした 3 か所の侵入菌糸をカウントした。侵入菌糸形成率は侵入菌糸数/発芽胞子数から算出した。

**野生株 104-T 株と *CoHox3* 遺伝子破壊株の侵入菌糸形成率の有意差は認められた。

表 9 ウリ類炭疽病菌のホメオボックス遺伝子とその機能

グループ	遺伝子	機能
HOX1	<i>CoHox4</i>	菌糸伸長、分生孢子形成、付着器形成、病原性
HOX2	<i>CoHox2</i>	分生孢子形成、病原性、剛毛形成
HOX3	<i>CoHox7</i>	関与なし
	<i>CoHox8</i>	未解析
	<i>CoHox9</i>	関与なし
HOX4	<i>CoHox5</i>	未解析
HOX5	<i>CoHox1</i>	侵入菌糸の形態分化、病原性
HOX6	<i>CoHox6</i>	関与なし
HOX7	<i>CoHox3</i>	付着器形成、病原性
HOX8	<i>CST1</i>	付着器侵入、病原性

*機能解析は病原性および形態分化のみ。