

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14662

研究課題名(和文) リンゴ斑点落葉病菌のAM毒素生合成遺伝子クラスターの起源を探る

研究課題名(英文) Investigation of the origin of the AM-toxin biosynthetic gene cluster in *Alternaria alternata* apple pathotype

研究代表者

柘植 尚志 (Tsuge, Takashi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30192644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ斑点落葉病菌(*Alternaria alternata* apple pathotype)は、宿主特異的AM毒素を生産し、毒素感受性のリンゴ品種に斑点性病害を引き起こす。先に、本菌の12個のAM毒素生合成遺伝子(AMT)のうち7個が、*Mycosphaerella*属菌からの水平移動によって成立したことを示す結果を得た。本研究では、コムギ葉枯病菌(*M. graminicola*)の相同遺伝子領域が第2次代謝遺伝子クラスターであること、この領域の遺伝子群がコムギへの感染時に発現すること、本菌が人工培養時に毒性物質を生産することを見出し、葉枯病菌がAM毒素と構造類似の毒素を生産することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The apple pathotype of *Alternaria alternata* produces host-specific AM-toxin and causes *Alternaria* blotch on apple cultivars sensitive to AM-toxin. We previously found that seven of 12 AM-toxin biosynthetic genes (AMT genes) were generated via horizontal gene transfer from *Mycosphaerella* species. In this study, we analyzed structure and function of the AMT homologs (MgAMT genes) of *Mycosphaerella graminicola*. Structural analysis of the genomic region including the MgAMT genes found that the 90-kb region encodes seven MgAMT genes and six additional genes possibly involved in secondary metabolism. RT-PCR analysis showed that genes in this region were expressed in wheat leaves inoculated with the pathogen conidia from the early stage of infection. We also observed toxicity of culture filtrates of the pathogen to wheat leaves. These results suggest that *M. graminicola* produces toxic substance similar in structure to AM-toxin.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 菌類 植物 病原性 進化 宿主特異的毒素

1. 研究開始当初の背景

*Alternaria alternata* は自然界に広く生息する本来腐生的な糸状菌であるが、本菌にはそれぞれ異なる作物に病気を引き起こす7つの病原性系統(病原型, pathotype)が存在する。これら病原型の病原性は、宿主植物にのみ毒性を示す菌の第2次代謝産物(宿主特異的毒素)によって決定されている。したがって、7つの病原型は、腐生的 *A. alternata* がそれぞれ固有の毒素生産能を獲得することによって病原菌化したと考えられ、病害発生の根本現象である“腐生菌からの病原菌誕生(寄生性進化)”を研究するためのモデルである。

研究代表者らは、5つの病原型(リンゴ斑点落葉病菌、ナン黒斑病菌、イチゴ黒斑病菌、タンゼリン brown spot 菌およびトマトアルターナリア茎枯病菌)から毒素合成遺伝子クラスターを単離するとともに、それらクラスターが各病原型の1.8 Mb以下の小型染色体に座乗することを見出した。さらに、リンゴ斑点落葉病菌(AM毒素生産菌)、イチゴ黒斑病菌(AF毒素生産菌)、トマトアルターナリア茎枯病菌(AAL毒素生産菌)から、主要染色体(>2 Mb)は保持しているが、小型染色体のみが欠落した変異株を分離し、これら変異株が毒素生産性と病原性を完全に失うことを見出した。しかしながら、染色体欠落株の各種培地上での成育、胞子形成などは正常であることを観察し、これら染色体が生存・成育には必要でないが、植物寄生など特定の生活環に不可欠な染色体、いわゆる Conditionally Dispensable (CD) 染色体であることを明らかにした。

リンゴ斑点落葉病菌は、AM毒素を生産し、毒素感受性のリンゴ品種に斑点性病害を引き起こす(図1)。申請者らは、11個の酵素と1個の転写制御因子をコードする約60 kbのAM毒素合成遺伝子(AMT)クラスターを同定した。また、これら酵素遺伝子のうち

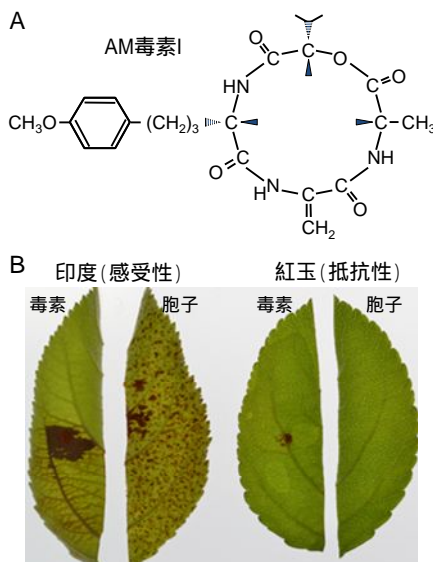


図1. (A)リンゴ斑点落葉病菌のAM毒素。(B)AM毒素の毒性。毒素液を有傷処理、胞子を噴霧接種、24時間後。

7個の相同遺伝子が系統的に離れたコムギ葉枯病菌(*Mycosphaerella graminicola*)ゲノムにクラスターとして存在し、さらにバナナ black shigatoka 病菌(*M. fijiensis*)、ポプラ bark canker 病菌(*M. populorum*)からもそれぞれ4個、5個の相同遺伝子クラスターが見出された(図2)。この結果は、AMTクラスターの一部が *Mycosphaerella* 属菌で成立し、*A. alternata* に水平移動したことを示唆する、重要な発見であった。さらに、これら病原菌の相同遺伝子クラスター近傍には二次代謝関連の他の酵素や転写制御因子もコードされていることを見出した。

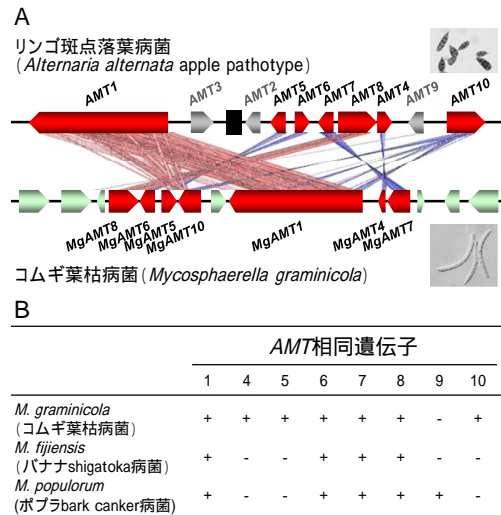


図2. (A)リンゴ斑点落葉病菌とコムギ葉枯病菌の相同遺伝子クラスター領域。(B) *Mycosphaerella* 属菌におけるAMT相同遺伝子の分布。

2. 研究の目的

リンゴ斑点落葉病菌のAMT遺伝子群の分子系統解析によって、12個の遺伝子のうち7個が *Mycosphaerella* 属菌からの水平移動、残りの5個がゲノム内での遺伝子重複という“合わせ技”によって成立したことを示唆した。次の疑問は、「両菌の相同遺伝子は同じ機能(酵素活性)を持つのか?」、「*Mycosphaerella* 属菌のAMT相同遺伝子(MgAMT)は何らかの機能をもつのか?」である。植物病原菌からは、宿主特異的・非特異的毒素も含め、多くの生理活性ペプチドが単離・同定されている。コムギ葉枯病菌のMgAMT領域を含む約90 kbの領域には、ペプチド合成の鍵酵素である非リボソーム型ペプチド合成酵素(MgAMT1産物)、Zn2Cys6型の転写制御因子などもコードされており、典型的な第2次代謝クラスターの特徴を有している。これらの特徴は、MgAMT領域と葉枯れ症状を引き起こす“毒素”との関連を連想させる。

本研究では、コムギ葉枯病菌のMgAMT領域の構造を詳細に解析するとともに、両菌の相同遺伝子の機能を比較解析することによって、*A. alternata*の病原性(宿主特異的毒素合成)進化をもたらした起源遺伝子群の機

能を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 公開されているコムギ葉枯病菌のゲノムデータベース (<http://genome.jgi.doe.gov/Mycgr1/Mycgr1.home.html>) から、*MgAMT* クラスターを含む領域を抽出し、近傍領域にコードされる遺伝子群の再アノテーションとデータベース相同性解析によって、第2次代謝に関与する可能性のある遺伝子群を推定した。さらに、それら遺伝子のコムギ感染時における発現を RT-PCR によって経時的に検出した。

(2) リンゴ斑点落葉病菌とコムギ葉枯病菌の相同遺伝子の機能を比較するために、リンゴ斑点落葉病菌の *AMT* 破壊株のコムギ葉枯病菌相同遺伝子による変異相補を試みた。*MgAMT* 遺伝子のプロモーターでは、リンゴ斑点落葉病菌で発現しない可能性が考えられた。そこで、約 1.0 kb のプロモーター配列と約 0.5 kb のターミネーター配列を含む各 *AMT* 遺伝子をクローン化し、そのエクソン・イントロン領域を対応する *MgAMT* に置き換えた変異相補ベクターを作製した。変異相補ベクターによって、*AMT* 破壊株を形質転換し、形質転換体の培養時の AM 毒素生産量を HPLC によって定量した。

(3) コムギ葉枯病菌が AM 毒素と構造が類似した代謝産物を生産することが予想され、両菌の宿主範囲が重複する可能性も考えられた。そこで、リンゴ斑点落葉病菌のコムギに対する病原性、コムギ葉枯病菌のリンゴに対する病原性を孢子接種によって検定した。また、AM 毒素のコムギに対する毒性、コムギ葉枯病菌培養液のリンゴに対する毒性を検定した。

(4) コムギ葉枯病菌の *MgAMT* 遺伝子の機能を遺伝子破壊実験によって解析するために、本菌のアグロバクテリウムを用いた形質転換の条件設定を行った。

### 4. 研究成果

(1) コムギ葉枯病菌の *MgAMT* 領域を含む約 90 kb のゲノム領域の構造を詳細に解析し、25 個の遺伝子を推定した。さらに、それらのデータベース相同性解析によって、7 個の *MgAMT* 遺伝子に加え、第2次代謝に関与すると推定される 6 個の遺伝子(アシル CoA 合成酵素、O-メチルトランスフェラーゼ、短鎖脱水素酵素、4-クマル酸 CoA リガーゼ、アセチル基転移酵素、Zn(II)2Cys6 ファミリー転写因子)を同定した。

これら遺伝子の植物感染時の発現様式を解析するために、接種 7、11、15、19 日後に採取したコムギ葉から RNA を抽出し、25 個の遺伝子の発現を RT-PCR によって検出した。なお、接種 11 日後から葉枯れ病徴が出現し、

19 日後に葉全体が枯死した。RT-PCR の結果、病徴が出現していない接種 7 日後から、第2次代謝関連遺伝子群が発現し、病徴進展に伴い、発現レベルが増加する傾向が認められた。この結果は、*MgAMT* 領域の産物がコムギ感染時に生産されること、その産物が病原性に関与する可能性を示した。

(2) 両菌の 7 個の相同遺伝子(図 2)のうち 6 個について、変異相補実験によってそれらの機能を比較した。なお、*AMT1/MgAMT1* はペプチド合成の鍵酵素である非リボソーム型ペプチド合成酵素をコードするが、13 kb を超えるサイズの大きな遺伝子であり、全長のクローン化、変異相補ベクターの作製が容易ではなかったため、今回の解析からは除外した。

リンゴ斑点落葉病菌の *AMT4*、*AMT5*、*AMT6*、*AMT7*、*AMT8* および *AMT10* は、ゲノム中にそれぞれ 4 コピー存在するが、それらの 1 コピーまたは 2 コピー破壊株は AM 毒素生産性が顕著に低下する。そこで、毒素生産性が顕著に低下していることが確認された破壊株に、それぞれの *MgAMT* 相補ベクターを導入した。その結果、*AMT5*、*AMT6*、*AMT8*、*AMT10* の破壊株では、*MgAMT* 相補ベクターの導入によって AM 毒素生産性が回復したが、*AMT4*、*AMT7* の破壊株では回復しなかった(図 3)。なお、*AMT4* 破壊株と *AMT7* 破壊株の形質転換体には、全長の相補ベクターが挿入され、*MgAMT4*、*MgAMT7* がそれぞれ発現していることを確認した。以上の結果は、両菌の相同遺伝子の一部は機能(基質)が異なることを示した。

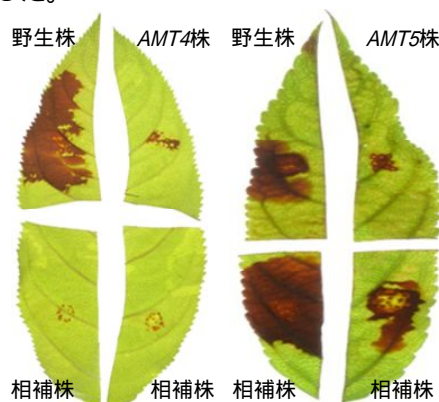


図3. リンゴ斑点落葉病菌の *AMT* 変異株の *MgAMT* による変異相補. 各菌株の培養液を有傷処理、24時間後.

(3) リンゴ斑点落葉病菌孢子懸濁液をコムギ葉に噴霧接種または注入接種したところ、接種後 6 日後でも病徴は出現しなかった。また、コムギ葉枯病菌孢子懸濁液をリンゴ葉に無傷または有傷ドロップ接種したところ、接種後 6 日後でも病徴は出現しなかった。以上の結果は、リンゴ斑点落葉病菌はコムギに、コムギ葉枯病菌はリンゴに感染できないことを示した(図 4)。



リンゴ斑点落葉病菌のAM毒素をコムギ葉に注入処理した。リンゴ葉に毒性を示す100倍の濃度(1 µg/ml)で処理した場合にも壊死は出現せず、AM毒素がコムギ葉に毒性を示さないことが確認された。コムギ葉枯病菌をジャガイモ煎汁液体培地、酵母エキス液体培地で静置または振とう培養し、培養液をコムギ葉とリンゴ葉に処理した。その結果、培地、培養条件によって活性に差があるものの、本菌の培養液がコムギ葉、さらにリンゴ葉にも壊死を引き起こし、本菌が培養時に毒素を生産することが示唆された(図4)。

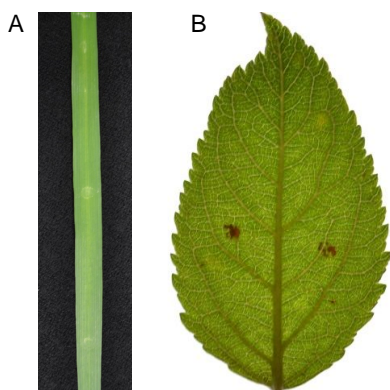


図4. リンゴ斑点落葉病菌のコムギ、コムギ葉枯病菌のリンゴに対する病原性。(A) リンゴ斑点落葉病菌の孢子懸濁液をコムギ葉に注入接種、6日後。(B) コムギ葉枯病菌の孢子懸濁液をリンゴ葉の有傷部にドロップ接種、6日後。

(4) *MgAMT* クラスターによって生産される代謝産物の機能を解析するためには、*MgAMT* 遺伝子破壊株を作成する必要がある。葉枯病菌は培地上での成育が非常に遅く、プロトプラストを用いた形質転換が容易ではないが、アグロバクテリウムを用いた形質転換系が報告されている。そこで、ハイグロマイシンB 抵抗性遺伝子をマーカーとするバイナリーベクターを用いて、コムギ葉枯病菌の孢子または酵母様細胞のアグロバクテリウム形質転換条件を検討し、その条件を設定した。

本研究では、コムギ葉枯病菌の *MgAMT* 領域が第2次代謝の遺伝子クラスターであること、この領域の遺伝子群がコムギへの感染初期から発現していること、さらに本菌が少なくとも人工培養時に毒性物質を生産することを見出した。また、相同な *AMT/MgAMT* 遺伝子の機能比較によって、コムギ葉枯病菌がAM毒素と構造類似の代謝産物を生産することがさらに示唆された。今後、*MgAMT* の遺伝子破壊実験によって、リンゴ斑点落葉病菌の病原性(AM毒素生産)進化をもたらした起源遺伝子群の機能について、より本格的な研究展開の道が拓かれた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

### [雑誌論文](計4件)

Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., and Kodama, M. (2016). Functional characterization of putative G protein-coupled receptors in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 査読有, 82: 82-88. DOI 10.1007/s10327-016-0647-x

Takao, K., Akagi, Y., Tsuge, T., Harimoto, Y., Yamamoto, M., and Kodama, M. (2016). The global regulator LaeA controls biosynthesis of host-specific toxins, pathogenicity and development of *Alternaria alternata* pathotypes. *J. Gen. Plant Pathol.*, 査読有, 82: DOI 10.1007/s10327-016-0656-9

Tsuge, T., Harimoto, Y., Akagi, Y., Hanada, K., Kodama, M., Akimitsu, K., and Yamamoto, M. (2016). Evolution of pathogenicity controlled by small dispensable chromosomes in *Alternaria alternata* pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 査読有, DOI: 10.1016/j.pmpp.2016.02.009

柘植尚志 (2016). 宿主特異的毒素研究. 植物感染生理談話会論文集(第51号) 感染生理談話会の50年~古きを温めて、新しきを知る~(中屋敷均ら編), 日本植物病理学会, 東京, 査読無, pp. 57-69.

### [学会発表](計4件)

赤木靖典, 柘植尚志, 有江力, 児玉基一郎 *Alternaria alternata* 病原型が保有する conditionally dispensable chromosome の起源. 日本植物病理学会関西支部会, 2015年9月29日, あわぎんホール(徳島)

赤木靖典, 柘植尚志, 有江力, 児玉基一郎 非病原性 *Alternaria alternata* における conditionally dispensable chromosome 様染色体の構造解析. 日本植物病理学会大会, 2016年3月21日, 岡山コンベンションセンター(岡山)

柘植尚志 宿主特異的毒素研究. 日本植物病理学会植物感染生理談話会「感染生理談話会の50年~古きを温めて、新しきを知る~」, 2016年8月11日, シーパル須磨(神戸)

森汐理, 宮川泰輝, 後藤千保, 川瀬めぐみ, 播本佳明, 花田耕介, 児玉基一郎, 山本幹博, 柘植尚志 *Mycosphaerella* 属菌ゲノムに存在するリンゴ斑点落葉病菌のAM毒素生合成遺伝子クラスターの相同領域. 日本植物病理学会関西支部会, 2016年9月29日, 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ(静岡)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号: 30192644