

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2006～2008
課題番号：18380030
研究課題名 (和文) トマト萎凋病菌非病原力決定ゲノム領域の機能・構造・由来の解析
研究課題名 (英文) Analyses of function, structure, and origin of the avirulence-determining genomic locus in the tomato wilt fungus, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
研究代表者 有江 力 (ARIE TSUTOMU)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授
研究者番号：00211706

研究成果の概要：

レース1抵抗性品種に対する病原力を獲得したトマト萎凋病菌レース1の変異株では、転移因子の挿入によってゲノム上の *SIX4* 遺伝子が破壊されていた。*SIX4* が破壊される事で病原力を獲得している事から、*SIX4* がコードするタンパク質がレース1抵抗性に対する非病原力決定因子である事が示唆された。転移因子が非病原力決定遺伝子領域に挿入されることで病原力を獲得する、新型の病原菌が生じるメカニズムを示した。この非病原力決定遺伝子領域周辺には複数の転移因子が存在する事、また、分子系統的には離れたキャベツ萎黄病菌が同じ遺伝子を持つ事から、この領域の水平移動の可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	7,800,000	0	7,800,000
平成19年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
平成20年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	2,250,000	17,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物病原菌、非病原力遺伝子、転移因子、変異株、新型病原菌、進化、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

微生物-植物の相互関係の中での認識・攻撃・防御のせめぎ合いの結果、病気の成否が決定される。このうちで最も明解なのが、遺伝子対遺伝子説で説明される「病原菌レース-植物品種間における非病原力決定遺伝子-抵抗性遺伝子の関係」である。すなわち、植物の抵抗性遺伝子産物が、病原菌が産生す

る非病原力決定遺伝子産物を認識して一連の抵抗性反応を発動し、自らを病原菌から防御する。その結果、非病原力遺伝子を有する病原菌はそれに対応する抵抗性遺伝子を持つ植物品種を侵すことができず、逆に非病原力決定遺伝子を有さない病原菌は当該品種を侵せることになる。これまで、トマト葉かび病など複数の病原菌-植物の関係におい

て、非病原力決定遺伝子とそれに対応する抵抗性遺伝子の存在がそれぞれ示唆され、一部では遺伝子同定・機能解明もされた。病原菌が保持する非病原力決定遺伝子およびその機能を解析することは、病原菌-植物の相互認識機構、病原菌の病原性進化機構などの解明、さらには、植物病害の効率的な制御法の確立につながる。

トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) は、トマトに重篤な被害を及ぼす難防除土壌感染性病原菌である。トマト萎凋病菌は、抵抗性品種の育成を凌駕するかのごとく新レースを発生、その結果抵抗性品種の無効化という大きな問題を引き起こしてきた。トマト萎凋病菌レース-トマト品種の関係も遺伝子対遺伝子説で説明するに矛盾は無いが、これまで、非病原力決定ゲノム領域や非病原力決定遺伝子は未同定であった。

研究代表者は、トマト萎凋病菌-トマトをモデル系として、発病機構を明らかにし、その結果をもとに防除法を確立することを構想して研究を推進している。その一環として、トマト萎凋病菌の抵抗性品種を侵すことができる変異株 (病原力獲得変異株) を用いて、非病原力決定遺伝子の解析を行う事にした。遺伝子対遺伝子説に基づけば、この変異株では、本来有していた非病原力決定遺伝子 (*AVRI*) が破壊されている (*avrI*) ことになる。このような株を利用することで、これまで明らかになっていないトマト萎凋病菌の非病原力およびそれに関連するトマト萎凋病菌-トマトの相互関係を明らかにできるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

トマト萎凋病菌レース 1 の非病原力決定ゲノム領域の機能・構造・由来の解析を進めるために本研究を推進した。具体的には、以下に掲げた疑問に対する答えを明らかにすることを目的とした。

- (1) 非病原力決定遺伝子が破壊されると、トマト萎凋病菌レース 1 は抵抗性品種を侵せるようになるのか? = 非病原力決定遺伝子領域は存在するのか?
- (2) 非病原力決定ゲノム領域にはどのような非病原力決定因子 (タンパク質か、RNA か?) がコードされているのか?
- (3) 同領域の構造は?
- (4) トマト萎凋病菌レース 1 のみが同領域を保持しているのか?

これらの疑問に対する答えを総合すると、トマト萎凋病菌レース 1 が保持するレース 1 抵抗性品種に対する非病原力の概要 (機能) が明らかになる。さらに、病原性進化に係わる非病原力決定因子の獲得・喪失機構 (構造・由来) について考察できる。

3. 研究の方法

- (1) トマト萎凋病菌レース 1 由来の、レース 1 抵抗性品種に対する病原力獲得変異株を取得する。
- (2) (1) で得られた変異株ゲノム上で変異が生じている領域を明らかにし、当該ゲノム領域がレース 1 の非病原力を決定していることを遺伝子破壊実験、相補実験等によって確認する。
- (3) 非病原力決定ゲノム領域の構造を精査する。特に、レース 1 と、レース 1 菌株から得られた病原力獲得変異株の当該ゲノム領域の構造を比較する。
- (4) 非病原力決定ゲノム領域のゲノム (染色体) 上の存在様式を、塩基配列情報、CHEF サザン法等によって解析する。
- (5) 非病原力決定ゲノム領域由来の産物について、性状・機能推定・発現について解析を行う。
- (6) 非病原力決定ゲノム領域を保持するのがレース 1 菌株のみなのか、他レース菌株および他分化型菌株についても PCR やゲノムサザン法等で解析する。この解析で得られる結果は、(5) の機能解析、および、(3)、(4)、(7) の解析結果と併せて非病原力決定ゲノム領域の由来や獲得メカニズムの解析に有効である。
- (7) 非病原力決定ゲノム領域の有無や rDNA-IGS 領域塩基配列等に基づく *F. oxysporum* 菌株の分子系統との関連について解析する。これは(6)とともに、非病原力決定ゲノム領域の由来や獲得メカニズムの解析に有効である。
- (8) 二次元電気泳動によって非病原力菌株と病原力菌株が産生するタンパク質発現プロファイルを比較し、非病原力および病原力に關与する因子を探索、解析する。これは、非病原力決定ゲノム領域にコードされる因子の下流で発現する因子の解明や、非病原力決定因子と他の病原力關連因子との相互関係の解析につながり、(6)で行う非病原力決定因子の機能解析に有益な情報を与える。

4. 研究成果

(1) 病原力獲得変異株の取得

研究開始時点では、REMI (Restriction enzyme mediated integration) 法によって作出したトマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) レース 1 菌株由来のレース 1 抵抗性品種 (*I*) に対する病原性獲得変異株 (レース 1 抵抗性品種に感染できるようになった株) r120 を解析対象とすることを予定していた。r120 において、プラスミドが挿入されたゲノム領域がレース 1 の非病原力を決定していることを想定、これを確

認するため、同領域を PCR 法等を駆使して取得、レース 1 菌株の同領域の破壊実験を行った。しかし、予想と異なり、破壊株はレース 1 抵抗性品種に感染できず、同領域がレース 1 の非病原力を決定していることを確認できなかった。

そこで、新たな病原性獲得変異株の取得を、発生圃場での探索および、REMI 法による変異株作出の 2 通りの手段で試みた。

従来萎凋病が発生していなかった高知県の圃場でレース 1 抵抗性トマト品種に萎凋病の発生が報告された。この罹病個体から分離された菌株 (KoChi-1) は新型のトマト萎凋病菌であり、新たな非病原性遺伝子領域解析の対象とすることにした。

なお、2007 年に *F. oxysporum* のゲノム情報が Broad Institute のデータベースに公開され利用が可能になったため、研究手法等を当初の予定と一部変更して解析を促進した。

(2)非病原性遺伝子領域

Houterman ら (2008) によって報告されたトマト萎凋病菌の非病原性決定遺伝子 *SIX4* (=AVRI) が KoChi-1 では、転移因子の挿入によって破壊されている事を見いだした (図 1a)。転移因子の挿入によって、本来 244 aa. である *SIX4* のかわりに、aa. 109 以降でアミノ酸配列の異なる 177 aa. の変異タンパク質が作られる (図 1b)。すなわち、転移因子の挿入によって正常な *SIX4* が作られなくなった事が、KoChi-1 株が抵抗性品種に対する病原性を獲得した原因であることが示された。これは、通常は、*SIX4* タンパク質が非病原性決定因子として抵抗性品種に認識され、その結果植物組織中で抵抗性が誘導される事を示唆した。KoChi-1 株とレース 1 株の *SIX4* 遺伝子領域 (*SIX4* およびその周辺領域 5'側 730 bp、3'側 520 bp) を比較したところ、転移因子の挿入を除き、ほぼ相同であった。*SIX4* はトマト萎凋病菌ゲノム上に 1 コピーのみ存在していた。

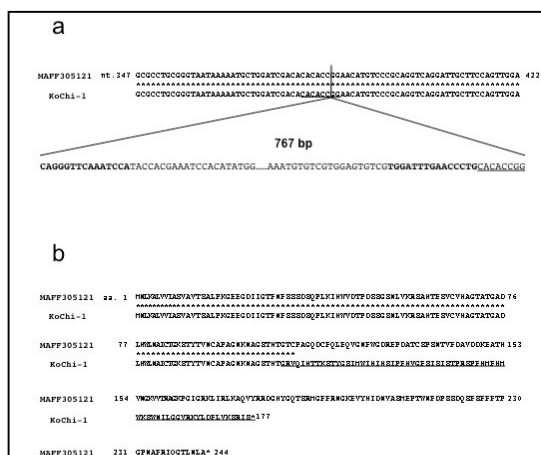


図1 KoChi-1株の*SIX4*遺伝子に転移因子が挿入され (a)、その結果、正常な*SIX4*タンパク質が作られない (b)

SIX4 遺伝子周辺にはさらに複数の転写因子の存在が認められ、この領域の変異が豊富である可能性、水平移動等によって病原性関連因子の取り込み・喪失・変異が起きている可能性が示唆された。

この領域が座乗している染色体については CHEF サザンで解析を進めたが現時点では明らかにできていない。

(3)転写因子の構造

KoChi-1 株で非病原性決定遺伝子 *SIX4* を破壊していた転移因子は、767 bp からなり、8 bp の target site duplication (CACACCGG) および 15 bp の inverted tandem repeat (ITR ; CAGGGTTCAAATCCA) を保持していた (図 1a)。この構造上の特徴は、クラス II (DNA) トランスポゾンの *hAT* ファミリーに属する転移因子に類似している。

本転移因子の塩基配列に基づいて *F. oxysporum* (トマト萎凋病菌レース 2 株) のゲノムデータベースを探索したところ、134 のホモログの存在が認められ、本転移因子が *F. oxysporum* ゲノムに普遍的に分布している事が示唆された。

(4)トマト萎凋病菌の分子系統と非病原性決定遺伝子 (*SIX4*) 保持の関係

F. oxysporum 菌株の rDNA IGS 領域の塩基配列に基づく分子系統樹において、トマト萎凋病菌は 3 つのクラスター (A1~A3) のいずれかに含まれる。各クラスターには、いずれのレース (1~3) の菌株も含まれ、分子系統とレースの相関は認められない。

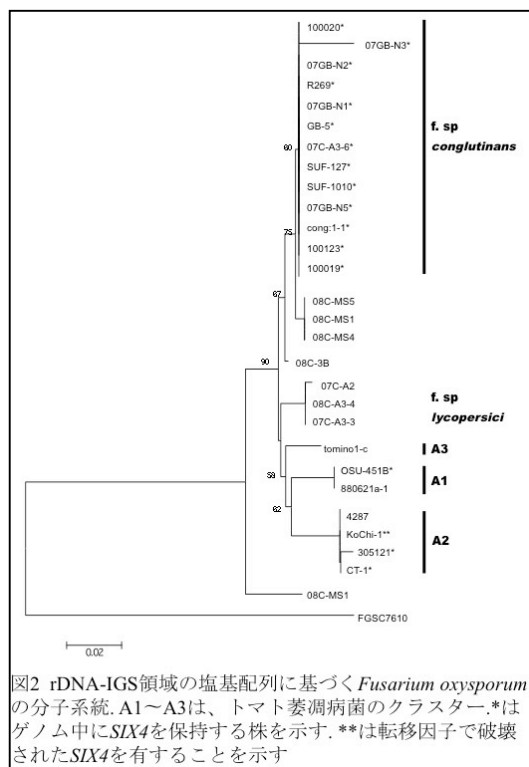
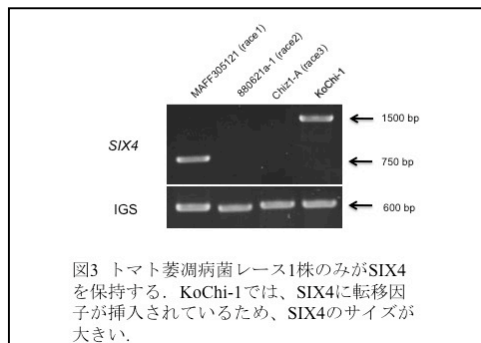


図2 rDNA-IGS領域の塩基配列に基づく *Fusarium oxysporum* の分子系統。A1~A3は、トマト萎凋病菌のクラスター。*はゲノム中に *SIX4* を保持する株を示す。**は転移因子で破壊された *SIX4* を有することを示す

しかし、日本産のトマト萎凋病菌に限ると、

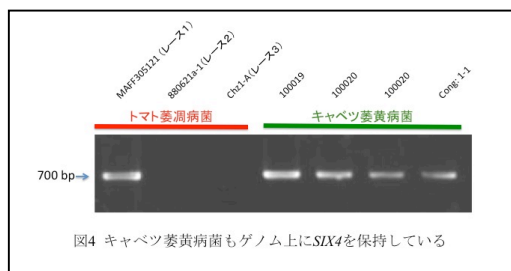
分子系統とレースに相関があり、レース 1、2、3 菌株はそれぞれクラスターA2、A1、A3 に含まれる (図 2)。

従って、日本産トマト萎凋病菌菌株では、クラスターA2に含まれる株 (レース 1) のみが *SIX4* を保持、クラスターA1 および A3 に含まれる菌株 (レース 2 および 3) は *SIX4* を保持しない (図 2~3)。今回取得した KoChi-1 株はクラスターA2 に含まれ、*SIX4* を保持するものの、*SIX4* には転移因子が挿入されて異常を生じている (図 2~3)。すなわち、KoChi-1 株は、クラスターA2 に含まれるレース 1 の非病原力決定因子が転移因子によって破壊されて生じた新型の病原菌である事が推察された。このように、新型病原菌出現のメカニズムの一端を明らかにすることができた。



(5)非病原力遺伝子領域 (*SIX4*) の存在範囲

正常な非病原力遺伝子領域 (*SIX4*) は、トマト萎凋病菌レース 1 菌株のみが保持し、レース 2 および 3 菌株は持たない。トマト萎凋病菌以外の *F. oxysporum* が *SIX4* を保持するかどうかを PCR 法で検定した。その結果、キャベツ萎黄病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*) が *SIX4* を保持している事を見いだした (図 4)。この他の分化型および非病原性 *F. oxysporum* 菌株は *SIX4* を保持していなかった。キャベツ萎黄病菌が何故トマト萎凋病菌レース 1 が持つ *SIX4* を持っているのか、キャベツ萎黄病菌でも *SIX4* が非病原力遺伝子として機能しているのかは不明である。キャベツ萎黄病菌でも *SIX4* が非病原因子として機能しているかどうかは、キャベツ萎黄病菌の *SIX4* を破壊し、萎黄病菌抵抗性キャベツ品種に接種する事で検証可能であると考えられる。しかし、*SIX4* 領域に転移因子が複数含まれる為か、現在まで *SIX4* の二回相同組換えによる遺伝子破壊は成功していない。



キャベツ萎黄病菌を含むアブラナ科植物を宿主とする *F. oxysporum* 菌株、トマト萎凋病菌レース 1~3 菌株の rDNA IGS 領域に基づく分子系統樹を作成した (図 2)。この中で、*SIX4* を持つ菌株をアスタリスクで示した。この系統樹中では、*SIX4* を保持する菌株は、2つのクラスター (キャベツ萎黄病菌からなるクラスターとトマト萎凋病菌レース 1) に分かれて存在した。このことは、*SIX4* が水平移動している事を示唆しており、Heuterman (2008) の示唆とも矛盾しない。

(6)その他の成果

非病原力と病原性で発現が異なる複数のタンパク質を見いだした。このうち、GMC オキシドリダクターゼ (ODX1)、アスパラギン酸プロテイナーゼ (FAP1)、ペルオキシレドキシシン様タンパク質 (HYR1) をコードする遺伝子 *odx1*、*fap1*、*hyr1* の破壊によっても、病原性等に変化は起きず、これらが病原性に関連しない事を明らかにした。

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 7 件)

- (1) Hirano Y, Arie T (2009) Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolated based in nucleotide sequence of polygalacturonase genes. *Microbe & Environ* **24**:113-120 (査読有り)
- (2) Balogun OS, Hirano Y, Teraoka T, Arie T (2008) PCR-based analysis of disease in tomato singly or mixed inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 1 and 2. *Phytopathol Mediterr* **47**:50-60 (査読有り)
- (3) Yoshida T, Kawabe M, Miyata Y, Teraoka T, Arie T (2008) Biocontrol activity in a nonpathogenic REMI mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and characterization of its disrupted gene. *J Pestic Sci* **33**:234-242 (査読有り)
- (4) 有江 力 (2008) *Fusarium oxysporum* における病原性の多様性. 土壌伝染病談話会レポート **24**:23-32 (査読無し)
- (5) Kawabe M, Okabe A, Teraoka T, Arie T (2008) Comparison of cellobiose dehydrogenase and cellobiose:quinone oxidoreductase activities between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its *FCD1*-disruptant. *Soil Microorganisms* **62**:43-47 (査読有り)
- (6) Kawabe M, Katsube K, Yoshida T, Arie T, Tsuchiya K (2007) Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in

Japan based on phylogenetic analyses of rDNA-IGS and MAT1 sequences. *J Gen Plant Pathol* 73:353-359 (査読有り)

- (7) Kawabe M, (2006) *FCD1* encoding protein homologous to cellobiose: quinine oxidoreductase in *Fusarium oxysporum*. *Gene* 382:100-110 (査読有り)

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 稲見圭悟(2009)トマト萎凋病菌レースのリアルタイム PCR による特異識別. 日本土壤微生物学会 2009 年度大会 (6 月 12~13 日、福岡市)
- (2) 吉岡千津(2009)トマト萎凋病菌およびレースのリアルタイム PCR 法による特異的検出. 日本植物病理学会平成 21 年度大会 (3 月 28 日、山形市)
- (3) 稲見圭悟(2009)トマト属植物から分離された非病原性 *Fusarium oxysporum* の分子系統解析と非病原力/病原力関連遺伝子領域の分布. 日本植物病理学会平成 21 年度大会 (3 月 27~28 日、山形市)
- (4) Arie T (2008) Genetical and phylogenetical studies on diversity and evolution of phytopathogenicity in *Fusarium oxysporum*. The Japan-Korea Basic Scientific Cooperation Program "2008 JSPS and KOSEF Joint Seminar" -Pioneering Researches on Fungal Molecular Biology (11 月 20 日、金沢市)
- (5) 有江 力 (2008) *Fusarium oxysporum* における病原性の多様性. 第 24 回土壌伝染病談話会 (9 月 10 日、南国市)
- (6) Inami K (2008) Phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* isolated from the tissues and rhizosphere of *Lycopersicon* spp. 10th International Fusarium Workshop and Fusarium Genomics Workshop (8 月 30~9 月 2 日、Arghero, Italy)
- (7) Inami K (2008) Phylogenetic analysis of *Fusarium oxysporum* isolated from the tissues and rhizosphere of *Lycopersicon* spp. 9th International Congress of Plant Pathology (8 月 24~29 日、Torino, Italy)
- (8) 吉岡千津(2008)土壌から抽出した eDNA を用いた、トマト萎凋病菌レースの識別法. 日本土壤微生物学会 2008 年度大会 (6 月 13~14 日、静岡市)
- (9) 本山 愛 (2007) *Fusarium oxysporum* におけるピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子の破壊. 第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス (11 月 15~16 日、文京区)
- (10) 本山 愛(2007) *Fusarium oxysporum* のアルコール発酵能は病原性に関わるのか. 第 6 回フザリウム研究会(8 月 31 日、蒲郡市)
- (11) 有江 力 (2007) NPF の生物防除機作. 第 6 回フザリウム研究会 (8 月 30 日、蒲郡市)

- (12) 本山 愛 (2007) トマト萎凋病菌のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のクローニング. 平成 19 年度日本植物病理学会大会 (3 月 30 日、宇都宮市)

- (13) 塩谷純一郎(2007) *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* の IGS 領域および *MAT1-I* の塩基配列に基づいた分子系統解析. 平成 19 年度日本植物病理学会大会 (3 月 30 日、宇都宮市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有江 力 (ARIE TSUTOMU)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授
研究者番号：00211706

(2) 研究分担者

寺岡 徹 (TERAOKA TOHRU)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
研究者番号：60163903
吉田 隆延 (YOSHIDA TAKANOBU)
農業環境技術研究所・生物生態機能研究領域・主任研究員
研究者番号：40355334

(3) 研究協力者

吉岡 千津 (YOSHIKA CHIZU)
東京農工大学・大学院農学府
稲見 圭悟 (KEIGO INAMI)
東京農工大学・大学院連合農学研究科
平野 泰志 (HIRANO YASUSHI)
埼玉県農林総合研究センター