

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06014・19K21154

研究課題名(和文) 小型染色体がもたらすフザリウムの宿主特異性決定機構の解明

研究課題名(英文) Study of small chromosomes associated with host-specificity in *Fusarium oxysporum*

研究代表者

鮎川 侑 (Ayukawa, Yu)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：80824474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：土壌病原菌 *Fusarium oxysporum* は、100種以上の植物に対して病原性を示すが、菌株によって宿主植物が異なっている。病原菌株は宿主特異性に関する小型染色体を保持していると考えられているが、宿主特異性の決定因子は特定されていない。本研究では、アブラナ科植物を宿主とする *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* のゲノム塩基配列を特定した。さらに、小型染色体上の2個の病原性遺伝子が、シロイヌナズナの免疫を抑制することを明らかにした。この成果は、*F. oxysporum* の宿主特異性の機構解明に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌病原菌フザリウムは、主要作物であるトマトやバナナなどに感染し、食料生産に多大な影響を与えている。フザリウムは菌株によって感染する植物が異なるが、宿主植物がどのように決まるかは不明である。本研究ではモデル植物であるシロイヌナズナに感染する菌株のゲノム解析を通して、病原性遺伝子を特定した。この成果は、フザリウムの宿主決定機構の解明の基盤となり、病害診断や耐病性植物の育種などの応用研究に波及し得る。

研究成果の概要(英文)：The soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* infects more than 100 plant species. Individual pathogenic isolates have different host ranges. Small chromosomes of some pathogenic isolates have been reported to be associated with host-specific virulence. However, determinants of host specificity in the small chromosomes have not been identified. In this study, we revealed genomic sequence of a crucifer-infecting pathogen, *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*. We found that two virulence genes in its small chromosomes are involved in suppression of *Arabidopsis*-immunity. This discovery will be useful for dissecting a mechanism of host specificity in *F. oxysporum*.

研究分野：植物病理学

キーワード：キャベツ萎黄病菌 シロイヌナズナ 宿主特異性 エフェクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病害の発生を決定づける最大の要因は、植物と病原菌の組み合わせである。特定の病原菌は、特定の植物種にのみ感染して発病させることができ、それを宿主特異性と呼ぶ。世界中で大きな土壌病害を引き起こしている土壌病原菌 *Fusarium oxysporum* は、100 種以上の植物に対して萎れ症状等を引き起こすが、宿主特異性が分化しており、菌株によって宿主植物が異なる。それぞれの宿主範囲に応じて 100 以上の分化型 (f. sp.) に区別されるが、宿主特異性の決定機構は不明である。病原菌は、抵抗性の打破や宿主因子の利用によって感染を成立させることから、宿主特異性の決定機構の解明には病原菌・宿主双方の知見が不可欠である。

病原菌に焦点を当てた研究では、トマトを宿主とする分化型 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*: *Fol*) で最も解析が進んでいる。生存に必須でないが宿主への病原性を司る小型染色体が、*Fol* から発見された()。小型染色体を喪失した *Fol* は、培地上では正常に生育するが、トマトに対する病原性を失う()。また、*Fol* の小型染色体は菌糸融合を介して菌株間を水平伝播することができ、小型染色体を獲得した非病原性菌株は、トマトに病原性を示すようになる()。申請者らは、アブラナ科植物を宿主とする分化型 (キャベツ萎黄病菌 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*: *Focn*) の小型染色体が病原性に関与することを明らかにしていた。*Focn* には生存に必須でない小型染色体が複数存在し、小型染色体喪失パターンに違いがある菌株が得られた。小型染色体喪失株の病原性を調査したところ、シロイヌナズナへの病原性を喪失するが、キャベツへの病原性が顕著に低下する株、またはキャベツに対する病原性が変化しない株が認められた。これらのことから、*F. oxysporum* の分化型の決定には、小型染色体に座乗する遺伝子が関与すると考えられる。しかし、どの遺伝子が宿主特異性に関与するかは明らかでない。

宿主植物に着目した研究では、*Focn* に対するシロイヌナズナの抵抗性や罹病性に関与する遺伝子が数多く特定されている()。一方で、*Fol* が標的とするトマトの遺伝子は、ほとんど明らかになってない。このように研究対象とされる病原菌と宿主植物の不一致により、「宿主特異性の決定に関与しうる宿主側および病原菌側の因子・標的」が明らかでない。*Focn* を解析することで、モデル植物から重要作物に及ぶ *F. oxysporum* の宿主特異性決定機構の解明に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

上述の通り、*Focn* から得られた小型染色体喪失株の中には、シロイヌナズナとキャベツへの病原性が異なる株が認められた。このことから、シロイヌナズナおよびキャベツそれぞれの宿主特異性に関与する遺伝子は別々の小型染色体に座乗すると推察できる。そこで本研究では“(1) *Focn* の小型染色体に座乗する遺伝子の発現解析”および“(2) 宿主特異性決定に関与する遺伝子の特定”を通して、*F. oxysporum* の宿主特異性決定機構のモデル系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Focn* の小型染色体に座乗する遺伝子の発現解析

小型染色体に座乗する遺伝子を特定するために、全ゲノムシーケンスを用いた *Focn* の野生株と小型染色体喪失株の比較ゲノム解析を行った。さらに小型染色体に座乗する病原性遺伝子(エフェクター遺伝子)を探索するために、エフェクター予測プログラムを用いて、ゲノム塩基配列からエフェクター候補遺伝子を探索した。次に、シロイヌナズナおよびキャベツ感染時のトランスクリプトーム解析を実施し、高発現するエフェクター候補遺伝子を選抜した。

(2) 宿主特異性決定に関与する遺伝子の特定

選抜した遺伝子が、宿主特異性の決定に必要なか調査するために、当該遺伝子を小型染色体喪失株へ導入し、病原性を調査した。次に当該遺伝子が他の分化型にも保存されているか調査した。

4. 研究成果

(1) エフェクター候補遺伝子の特定

Focn の野生株のゲノム解析を実施し、クオリティーの高いゲノム配列を得た。また、*Focn* から得た小型染色体喪失株のゲノム解析を行い、野生株のレファレンスゲノムにマッピングすることで、喪失した小型染色体(ゲノム領域)を特定した。小型染色体喪失株の病原性にもとづいて、シロイヌナズナおよびキャベツそれぞれへの病原性に必要と思われるゲノム領域を特定した。次に、エフェクター予測プログラム()を用いて、*Focn* の野生株のゲノム塩基配列から 260 個のエフェクター候補遺伝子を特定した。シロイヌナズナへの病原性に必要と思われるゲノム領域には、10 個のエフェクター候補遺伝子が含まれ、キャベツへの病原性に必要と思われるゲノム領域には、21 個のエフェクター候補遺伝子が含まれていた。さらに、トランスクリプトーム解析によって、感染時に発現する遺伝子を特定した。キャベツへの病原性に必要と思われる

ゲノム領域では1個のエフェクター候補遺伝子が高発現していた。この遺伝子は、キャベツへの病原性に関わるエフェクター遺伝子として既に報告された *SIX1* であった()。一方で、シロイヌナズナへの病原性に必要と思われるゲノム領域では、2個のエフェクター候補遺伝子が高発現していた。このエフェクター候補遺伝子のうち1個は、病原性に関与すると推定されている *SIX8* であった()。もう一方の遺伝子 *FocnC Cong_v001894* は、報告例のない新規遺伝子であった。興味深いことに、この2個の遺伝子はゲノム塩基配列上で隣接しており、転写方向は互いに反していた(図.1)。遺伝子間の塩基配列上には転移因子 miniature impala (*mimp*)様の塩基配列が挿入されていた。



図.1 シロイヌナズナ感染時に高発現する2個のエフェクター遺伝子

(2) *SIX8* および *PSE1* はシロイヌナズナへの病原性に関与する

SIX8 および *FocnC Cong_v001894* がエフェクター遺伝子であるか調査するために、シロイヌナズナへの病原性が低下した小型染色体喪失株に、*SIX8* および *FocnC Cong_v001894* の両方を含む遺伝子座、またはそのいずれかを導入した形質転換株を作出した。当該形質転換株によるシロイヌナズナへの接種試験を行った結果、*SIX8* または *FocnC Cong_v001894* のいずれかのみを導入した形質転換株では、病原性が復帰しなかったが、*SIX8* と *FocnC Cong_v001894* の両方を含む遺伝子座を導入した株では病原性が復帰した。従って、*SIX8* と *FocnC Cong_v001894* を含む遺伝子座がシロイヌナズナへの病原性に必要であることが示唆された。*FocnC Cong_v001894* は *SIX8* と共に働くエフェクター遺伝子と考えられることから、当該遺伝子を *Pair with SIX Eight 1(PSE1)* と命名した。

次に、*SIX8-PSE1* 遺伝子座が他の分化型にも保存されているか調査したところ、*Fol* やアブラナ科植物ストックやシロイヌナズナに感染する *F. oxysporum* f. sp. *matthirolae* から、*SIX8-PSE1* 遺伝子座と相同性のある塩基配列を特定した。現在、これらの相同性遺伝子座の病原的な役割を調査しており、これまでの結果と合わせて論文として報告する予定である。

本研究によって、*Focn* の高品質のゲノム塩基配列と、シロイヌナズナおよびキャベツ感染時における網羅的な遺伝子発現データが得られた。これらの成果は、*Focn* とシロイヌナズナの相互作用解析の基盤となり得る。さらに本研究では、シロイヌナズナに対するエフェクター遺伝子として、*SIX8* および *PSE1* を同定した。一方で、キャベツへの病原性に必要なゲノム領域に *SIX1* が座乗することを明らかにした。今後、これらのエフェクターの機能解析を実施することで、*Focn* の宿主特異性の分子機構の解明に繋がることが期待される。

< 引用文献 >

- Ma, L-J. *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**, 367–73 (2010).
- Vlaardingerbroek, I. *et al.* Dispensable chromosomes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1455–66 (2016).
- Berrocal-Lobo, M. & Molina, A. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci.* **13**, 145–50 (2008).
- Sperschneider, J. *et al.* EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* **210**, 743–61 (2016).
- Li, E. *et al.* A *SIX1* homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* is required for full virulence on cabbage. *PLoS One* **11**, e0152273 (2016).
- Schmidt, S. M. *et al.* MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* **14**, 119 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shuta Asai, Yu Ayukawa, Pamela Gan, Sachiko Masuda, Ken Komatsu, Ken Shirasu, Tsutomu Arie	4. 巻 8
2. 論文標題 High-quality draft genome sequence of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> strain 160527, a causal agent of panama disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00654-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鮎川侑、浅井秀太、小松健、Houterman Petra M.、Rep Martijn、白須賢、有江力
2. 発表標題 キャベツ萎黄病菌の病原性に関するゲノム領域の研究
3. 学会等名 第12回フザリウム研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎川侑、浅井秀太、小松健、Houterman Petra M.、Rep Martijn、白須賢、有江力
2. 発表標題 キャベツ萎黄病菌の病原性に関するゲノム領域に座乗するエフェクター候補遺伝子の特定
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎川侑、浅井秀太、Gan Pamela、津島綾子、小松健、Houterman Petra M.、Rep Martijn、白須賢、有江力
2. 発表標題 キャベツ萎黄病菌のSIX8-FocnCong_v001894遺伝子座はシロイヌナズナへの病原性に関する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayukawa Y., Asai S., Komatsu K., Houterman P. M., Rep M., Shirasu K., Arie T.
2. 発表標題 Dispensable chromosomes involved in vegetative growth and virulence in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>
3. 学会等名 The 30th Fungal Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayukawa Y.
2. 発表標題 Dispensable chromosomes involved in vegetative growth and virulence in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> .
3. 学会等名 Fusarium Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎川 侑
2. 発表標題 植物病原菌の小型染色体について
3. 学会等名 第4回農学中手の会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浅井 秀太 (Asai Shuta) (30723580)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員 (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	白須 賢 (Shirasu Ken) (20425630)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・グループディレクター (82401)	
研究協力者	有江 力 (Arie Tsutomu) (00211706)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	