

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06053

研究課題名(和文)植物病原菌の二次代謝産物生合成に依存した寄生・共生および腐生戦略の解明

研究課題名(英文)Studies on parasitic, symbiotic and saprophytic strategies depending on secondary metabolite production in plant pathogens

研究代表者

児玉 基一郎(Kodama, Motoichiro)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00183343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物病原系状菌は植物との共進化の結果として、多種多様な二次代謝産物生産能(=生理活性物質多様性創出システム)を発達させてきた。それら化合物は、菌における生存・発病ストラテジーのひとつとして、腐生菌(非病原菌)、共生菌および病原菌を分かつ要因となり、病原性の分化にも寄与している。ネクトロフ菌である*Alternaria*菌群は、同属中に腐生、寄生および共生系統を有し、菌の多様なライフスタイルを決定する分子機構解明のモデルとなる。本研究では、病原菌が保有する極めて多彩な二次代謝産物生合成系に焦点を当て、菌のライフスタイルの変遷・進化と多様性形成の仕組みを、系状菌ゲノミクスを基盤として解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Alternaria*菌群は、従来顧みられることの少なかった腐生菌から共生菌、さらに高度に分化した寄生菌まで幅広く包含するユニークなグループであり、菌の腐生性および寄生性の全体像を理解するための特色ある対象生物である。この特性を最大限に活用し、系状菌の特質でもある多彩なSM生合成系をターゲットにして、菌の生存・発病戦略の分子機構、多様性および進化を包括的に解析することが可能となった。腐生生活においても重要である二次代謝系の分子機構が解明されれば、寄生菌コントロールの一環として、腐生生活環をターゲットにすると全く新規な応用研究分野が創出され、そのインパクトは大である。

研究成果の概要(英文)：As a result of co-evolution with plants, plant pathogenic fungi have developed a wide variety of secondary metabolite production capabilities (= bioactive substance diversity generation system). These compounds are one of the survival and pathogenesis strategies of fungi, and are a factor in distinguishing saprophytic (non-pathogenic), symbiotic, and pathogenic fungi, and also contribute to the differentiation of pathogenicity. The necrotrophic fungus *Alternaria* group has saprophytic, parasitic, and symbiotic lineages within the same genus, and serves as a model for elucidating the molecular mechanisms that determine the diverse lifestyles of fungi. In this study, we focused on the extremely diverse secondary metabolite biosynthetic systems possessed by pathogenic fungi, and elucidated the transition and evolution of fungal lifestyles and the mechanism of diversity formation based on fungal genomics.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物病原菌 腐生菌 共生菌 二次代謝産物 ゲノミクス 遺伝子クラスター

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物毒素など多様な生理活性物質生産は、植物病原糸状菌の発病ストラテジーにおいて、極めて重要な位置を占める。そのため、一般的に病原菌は、腐生菌(非病原菌)と比較して多種多様な生理活性・化学構造を有する二次代謝産物(Secondary metabolite, SM)を生合成する。さらに SM は、宿主植物を加害するためだけではなく、宿主不在期間は、土壌中などにおける他者との競合と生存のため活用されている。また、エンドファイトでは、宿主との共生関係確立に SM が重要な役割を果たす。すなわち、SM は、腐生菌(非病原菌)、共生菌および病原菌を分かち要因のひとつとなり、さらに病原菌においてはエフェクター分子として病原性の分化に大きく寄与してきたと考えられる。

本研究では、糸状菌が生産する多様な SM に焦点を当てるが、特に毒素などの SM 生合成を菌の生存・発病ストラテジーの一つとしてとらえ、生合成の分子機構と多様性、また生合成系の進化について検討する。申請者は、これまで、世界的にもメジャーなネクロトロフ(necrotroph)植物病原菌である *Alternaria alternata* を対象として、特に、*A. alternata* tomato pathotype(トマトアルターナリア茎枯病菌)が生産するポリケチド毒素である AAL 毒素生合成遺伝子クラスターを同定した。また、本菌を含む *A. alternata* 菌群におけるゲノミクス研究を通して、ポリケチド合成酵素(PKS)遺伝子、非リボソーム型ペプチド合成酵素(NRPS)遺伝子を含む SM 生合成遺伝子クラスターの網羅的解析を進めている。*Alternaria* 属菌は、病原菌のみならず、腐生菌およびエンドファイト(共生菌)も含んでおり、菌の多様なライフスタイルを決定する分子機構解明の優れたモデル糸状菌である。さらに、本菌における遺伝子機能解析手法のブラッシュアップに務め、複数コピー遺伝子の場合でも、ほぼ 100% の確立で遺伝子ノックアウトを可能にした。また、遺伝子導入に関しても、最近、毒素生合成遺伝子クラスターを構成する 10 以上の遺伝子の同時導入・発現系を確立した。

以上の学術的背景から、「ゲノム情報」+「遺伝子機能解析法」という強力な研究手法を組み合わせることにより、ネクロトロフ菌類における生存・発病ストラテジーの分子機構と進化を、多彩な SM(エフェクター)生産をキーワードにして解明できる段階に到達していると考えている。この試みを通して、菌の SM 多様性創出システムの進化を基盤とした、腐生・寄生・共生生活を決定づける生存・感染戦略の実態は何か?、また、腐生菌から寄生菌(あるいは逆)への進化過程、さらに寄生性の分化・多様性形成メカニズムとは何か?という学術的「問い」に対する回答の一端が得られると期待される。

2. 研究の目的

下記の項目を通して、SM 生合成が介在するネクロトロフ菌の生存・発病戦略、多様性形成および進化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

(1) *Alternaria* 属の病原菌・腐生菌および共生菌間における比較・系統ゲノミクス

これまでに複数の *Alternaria* 属菌において、ドラフトゲノム解析データを取得している。計画では、さらにシーケンスデータの精度を向上させるとともに、*A. brassicae* など宿主を異にする他種病原菌、腐生・共生 *A. alternata* 系統のゲノムシーケンスを進め、比較ゲノミクスにより腐生菌、共生菌、寄生菌、また異なる寄生性の分化を示す菌系間における類似点、または相違点をゲノムレベルで明確にする。

(2) SM 生合成遺伝子クラスターの同定とカタログ化

ゲノムドラフトデータより、糸状菌 SM の主要化合物であるポリケチドおよび非リボソーム型ペプチド生合成に関わる遺伝子クラスター(中心は、PKS および NRPS 遺伝子)をカタログ化する。最終産物未同定のオーファンクラスターも含める。クラスターの数、種類、構成および構造を腐生菌-病原菌-共生菌間、また、病原性系統および種間で比較解析し、類似点と相違点を明確にする。対象には、グローバルレギュレーター *LaeA* など、SM 生合成制御遺伝子も含める。

(3) SM 生合成遺伝子群の網羅的機能解析、代謝産物の同定および進化・多様性形成過程の推定

異なるライフスタイルの菌株間(寄生 vs. 腐生、寄生 A vs. 寄生 B など)の比較により、候補遺伝子をピックアップし、順次、遺伝子 KO、異種内再構成(クラスターセットの異種菌内への導入・発現)、制御遺伝子改変によるクラスターのトータル発現制御などを組み合わせて、網羅的機能解析を達成する。さらに、エフェクター分子など実際のエンドプロダクトの同定を目指す。

以上の研究結果により、菌の SM 多様性創出システムの進化を基盤とした、腐生・寄生・共生生活を決定づける生存・感染戦略、また、腐生菌から寄生菌(あるいは逆)への進化過程、さらに寄生性の分化・多様性形成メカニズムの一端が明らかになる。

3. 研究の方法

(1) 病原菌・腐生菌・共生菌間における比較ゲノミクス

申請者は、すでに、数種の *Alternaria* 菌においてドラフトゲノム解析データを取得している。このうち、トマト茎枯病菌(*A. alternata* tomato pathotype) 1 菌株においては、scaffold 数 27 のほぼ完全なゲノムデータを得ることに成功し、本研究における基準(リファレンス)データとして

活用予定である。ネクロトロフ菌 *Alternaria* の比較・系統ゲノミクス解析が本研究の基盤をなすが、予定通り進行しない場合、計画全体に大きくブレーキをかける可能性が予期される。そこで対応策として、菌類ゲノミクスおよび SM 生合成研究の世界的リーダー研究者である米国コーネル大学 B. G. Turgeon 教授を研究協力者（外部アドバイザー）として、国際共同研究を行う。菌類ゲノム DB リソースも活用して効率的に遂行予定であり、迅速に目的に到達する研究体制を本研究のために構築・準備した。

従来、解析対象となる機会の少ない腐生性（非病原性）系統についても十分な解析を行う点が、本研究の強調すべきポイントのひとつである。腐生性 *A. alternata* ターゲット株の一つは、申請者らがペルー共和国のトマト野生種より分離した系統である。比較病原菌であるトマト茎枯病菌は宿主特異的 AAL 毒素生産菌であり、毒素生合成遺伝子（ALT）クラスターは本菌が保有する 1 Mb の小型染色体（CDC）に座乗している。本染色体の解析から、われわれは、宿主特異的毒素に依存する植物病原菌における病原性の進化と多様性形成過程に、CDC の水平移動（伝播）が関与しているとの作業仮説（染色体水平移動説）を提唱した。本染色体は病原性染色体と呼ぶにふさわしい。このような小型染色体は *A. alternata* 病原性系統に特徴的であり、従来、腐生性系統からは見出されず、その起源、由来は不明であった。これまでに、国内外の 200 菌株以上の腐生性菌株における PFGE スクリーニングの結果、ペルー産株で構造類似の小型染色体（ALT クラスターを含まない）保有腐生性系統を見出した。本菌はプロト病原性染色体を保有する、現在のトマト菌のプロト病原菌株である可能性が高く、病原性の進化を探る格好の遺伝資源である。

（2）SM 生合成遺伝子クラスターの同定とカタログ化

比較対象菌株において、ドラフトシーケンシング、*de novo* アセンブルおよび ORF 予測などが完了した後、すでに獲得している *A. alternata* 由来 PKS、NRPS 遺伝子等をクエリーにして、ローカル Blast 解析により、主要な SM 生合成遺伝子クラスターを網羅的に同定する。また、このような単一 SM 生合成遺伝子の検出によるクラスターの網羅的同定が困難であると予測される場合、本手順に加え、クラスター予測に、SMURF、SM 生合成遺伝子データベースなどを活用する。これまでの経験から、クラスター予測に際しては、菌類遺伝子クラスターの一般的構造に基づき、主要生合成遺伝子のみならず、周辺の制御遺伝子などをマーカーに活用することにより、精度の高い予測が可能になる。各種遺伝子クラスターにおいて、より多数のデータをカタログ化し、比較することにより、オーファンクラスター（生合成産物が未同定のクラスター）を含む、腐生菌・病原菌・共生菌に特徴的なクラスターをピックアップすることが可能である。

（3）SM 生合成遺伝子群の網羅的機能解析、代謝産物の同定および進化・多様性形成過程の推定

前項により、腐生菌-ネクロトロフ病原菌-共生菌間における進化、異なる宿主への寄生性の分化・適応過程解析のモデルとしての *A. alternata* 菌における、SM 生合成遺伝子クラスターの網羅的同定が完了する。その後、個々の SM クラスターをターゲットにした機能解析に基づく、菌の生存・発病戦略を決定する実行因子同定のステップを進める。

以上の研究結果により、菌の SM 多様性創出システムの進化を基盤とした、腐生・寄生・共生生活を決定づける生存・感染戦略、また、腐生菌から寄生菌（あるいは逆）への進化過程、さらに寄生性の分化・多様性形成メカニズムの一端を明らかにする。

4. 研究成果

トマトアルターナリア茎枯病菌 (*A. arborescens*) は、ポリケチド化合物である宿主特異的 AAL 毒素を生産し、ファースト系などの特定のトマト品種に病気を引き起こす。本毒素は、*Fusarium* 属病原菌が生産するマイコトキシンのフモニシンに化学構造および生物活性が類似している。フモニシンの生合成に関わる *FUM* クラスターは、PKS、トランスポーター、転写因子および複数の修飾酵素からなり、少なくとも 10 遺伝子がフモニシン生合成に関与している。一方、AAL 毒素生合成遺伝子（ALT）クラスターは茎枯病菌のみに存在し、ポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子（*ALT1*）、ABC トランスポーター、LAG 蛋白質、P450 等をコードする少なくとも 13 遺伝子群から構成されていた。遺伝子ターゲティングの結果より、クラスター遺伝子は、毒素生合成と同時に病原性発現に直接関与しており、ALT クラスターは病原性遺伝子クラスターとして機能していることが明らかとなった。ALT クラスターに含まれる遺伝子群は *FUM* クラスター中の遺伝子と相同性を示すが、個々の遺伝子の配列順序、転写方向は異なっていた（図）。

また、クラスター遺伝子の発現は、広範かつ強力な転写制御因子であるグローバルレギュレーター *LaeA* によってコントロールされていた。なお、ALT クラスター上において、予期せず酵母 *LAG1* オートログが見出された。本遺伝子は、酵母における寿命を左右する遺伝子として最初に単離された。その後トマトの茎枯病抵抗性遺伝子、すなわち AAL 毒素耐性遺伝子 *Asc1* が LAG 蛋白質をコードしていることが明らかとなった。本毒素は感受性トマトのセラミド合成系を阻害し、さらにアポトーシスを誘起することにより毒性を示す。抵抗性トマト品種および非宿主植物では、阻害されたセラミド合成系のサルベージ経路として *Asc1* が機能するため、病害抵抗性/毒素耐性となる。一方、トマト感受性品種では、本遺伝子に変異が入り機能しない。現在、これら *LAG1* ホモログは *LASS/Lag* ファミリーに属するセラミド合成酵素遺伝子として認識されている。また、*Asc1/Lag1* ホモログは *Arabidopsis thaliana* や寄生植物 *Orobancha cumana* においても見出され、同様に AAL 毒素感受性/抵抗性を支配している。本毒素によるセラミド合成系の

阻害は非特異的作用であり、その生産菌が毒素生成遺伝子クラスター内に植物が保有する耐性遺伝子オーソログを備えていることは何を意味するのか？その理由を検討するため茎枯病菌において遺伝子欠損株を作出したが、毒素耐性等に変化は認められなかった。

また、ゲノム解析の結果、Sordariomycetes に属する *Fusarium* 種、Eurotiomycetes に属する *Aspergillus niger* および Dothideomycetes に属する *C. heterostrophus* および *A. alternata* tomato pathotype の4種が *FUM* クラスターホモログを保存していることが示された。一方、*As. niger* を除く *Aspergillus* 属菌や、茎枯病菌を除く他の *Alternaria* では *FUM* ホモログは見出されない。以上の事実は、*FUM* クラスターの獲得・拡散過程に、菌株間における水平移動が関与した可能性を強く示唆する。また、他の necrotroph 菌であるトマト褐色輪紋病菌 (*Corynespora cassiicola*) が、*C. heterostrophus* race T の T-toxin 生成遺伝子クラスターをフルセットで保有しているとともに、病原因子として機能していることが示された。この場合も、遺伝子クラスター水平移動が病原性の進化に関与していることが示唆されている。

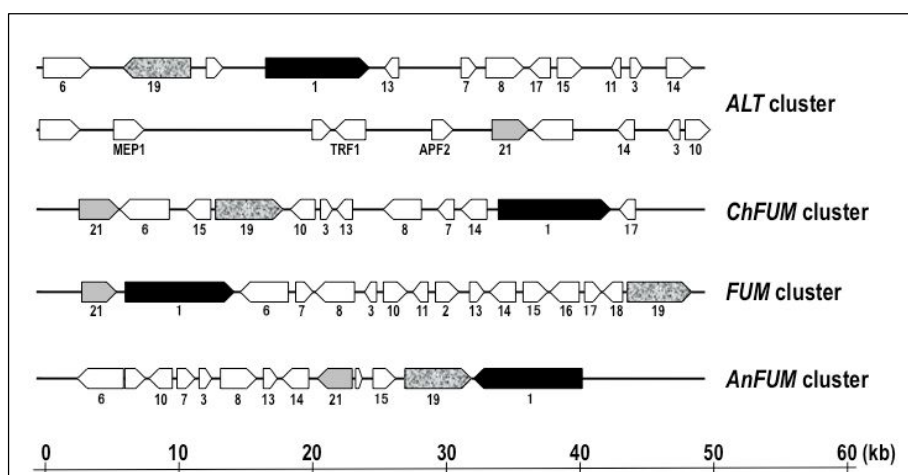


図 FUM クラスターホモログの構造比較

茎枯病菌の ALT クラスターは、本菌が特異的に保有する 1.0 Mb の小型染色体に座乗していた。この小型染色体は、*A. alternata* が共通して保有する essential 染色体 (EC) と塩基配列レベルの相同性が低い。本染色体を人為的に欠損させた場合、毒素生成能に加え病原性も失活するが、菌成長などには影響が皆無であることから、1.0 Mb 染色体は conditionally dispensable 染色体 (CDC) であると考えられた。ゲノムドラフト解析を含む各種データより、CDC は EC とは独立して、水平移動を通して *A. alternata* 集団中に伝播した可能性が考えられた。

病原性染色体/CDC の起源を解明するため、特にトマトの起源地である南米地域を中心として、世界各地で分離した *Alternaria* 菌株のゲノム解析を進めた。従来、非病原性 *Alternaria* において CDC は見出されていなかったが、PFGE 解析等を通して、世界各地で分離した非病原性 *Alternaria* 株のうち一部の菌株が、小型染色体を保有することが示された。さらに、ペルー由来の小型染色体保有菌株が、トマト病原型 CDC と相同性を示す CDC 様染色体 (proto-CDC) を保有することが明らかとなった。本 proto-CDC はトマト病原型 CDC と同様に isochromosome 構造を有するが、染色体上に AAL 毒素生成遺伝子クラスターは座乗していなかった。さらに、リンゴおよびイチゴ病原型 CDC と相同性を示す proto-CDC の保有株も見出された。以上の結果から、*Alternaria* 病原型が保有する病原性染色体は、これら proto-CDC に由来する可能性が示唆された。

HST 依存 *A. alternata* 病原菌群における病原性の進化と分化の分子機構に関して、今回明らかとなった内容は、主として病原性を支配する *Tox* クラスター / CDC が形成された後のストーリーである。しかし、糸状菌における *Tox* クラスターを含む二次代謝産物生成遺伝子クラスターの構造を眺めると、その合目的性には目を瞠る。このような遺伝子クラスターの由来、起源は何処にあるのか？そしてクラスターの集団内での拡散と保持のメカニズムは何であろうか？さらに、将来における新たな HST 生産菌や感受性植物の出現の可能性を予期し、激甚な被害を防ぐことは可能になるのか？このような疑問に答えるためには、病原菌側での二次代謝産物生成系の進化機構解明や、植物側における毒素感受性化の分子機構に関する包括的な理解が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 児玉 基一郎・赤木 靖典・高尾 和実・江草 真由美・有江 力・柘植 尚志	4. 巻 57
2. 論文標題 植物病原菌の二次代謝産物生合成に依存した寄生戦略の進化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 植物感染生理学研究会の未来. 植物感染生理談話会論文集	6. 最初と最後の頁 129-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Tsunami, R., Cabrera Pintado, R.M., Kodama, M., Komatsu, K. and Arie, T. et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Mutations found in the Asc1 gene that confer susceptibility to the AAL-toxin in ancestral tomatoes from Peru and Mexico	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10010047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 児玉 基一郎・赤木 靖典・高尾 和実・江草 真由美・有江 力・柘植 尚志
2. 発表標題 植物病原菌の二次代謝産物生合成に依存した寄生戦略の進化
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会植物感染生理談話会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福井瑛士・伊藤通浩・新里尚也・伊禮 信・長谷川 優・有江 力・木戸一孝・児玉基一郎
2. 発表標題 沖縄県内サトウキビ圃場から分離された細菌株の各種植物病原菌に対する阻害活性
3. 学会等名 2021年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児玉基一朗
2. 発表標題 果樹病害の現状とこれから
3. 学会等名 樹木医学会第26回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井瑛士・伊藤通浩・新里尚也・伊禮 信・有江 力・児玉基一朗
2. 発表標題 沖縄県内サトウキビ圃場から分離されたサトウキビ黒穂病菌胞子発芽阻害活性を示す細菌
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都筑 麟・Rosa Maria Cabrera Pintado・児玉 基一朗・小松 健・有江 力
2. 発表標題 AAL 毒素感受性を決定するAsc1 遺伝子の多様性解析に基づくトマト栽培化・進化に関する研究
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井瑛士・伊藤通浩・新里尚也・伊禮 信・有江 力・児玉基一朗
2. 発表標題 沖縄県内サトウキビ圃場から分離されたBacillus属菌のサトウキビ黒穂病菌およびバナナパナマ病菌に対する阻害活性
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Cornell University			
ニュージーランド	AgResearch			