

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06247・20K20298

研究課題名（和文）植物病原菌の起源を探る - 宿主特異的毒素を生産するアルタナリア病原菌を例として

研究課題名（英文）Exploring the origin of crop pathogens - host-specific toxin producing Alternaria pathogens as the case study

研究代表者

柘植 尚志（TSUGE, Takashi）

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：30192644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）： 農業現場では、新たに育成された作物種や作物品種の導入後、数年のうちに新病害が発生することがしばしば経験されている。新病害が早いタイミングで発生することから、病原菌は作物以外の植物に感染して生息し、新たに導入された感受性作物に移動したと推定される。

本研究では、宿主特異的毒素を生産する糸状菌Alternaria病原菌のうちリンゴ、ニホンナシ、イチゴに感染する系統について、宿主作物以外の感受性植物を探索し、その同定に成功した。同定した植物には、在来の野生植物も含まれており、病原菌の成立と維持の軌跡（病原菌の起源）への野生植物の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農業現場では、新病害の報告が後を絶たない。その一部は、苗、種子などに病原体が付着して海外から持ち込まれたものであるが、我が国で初めて見つけた微生物種や系統（土着微生物）による新病害も多数報告されている。また、近年の新病害の発生には、栽培様式の多様化も関係している。自然界では、土着の潜在的病原菌が、感受性の作物種・作物品種の登場や感染に適した栽培環境の変化を待ち受けているようである。本研究では、Alternaria病原菌を用いて、潜在的病原菌の自然界での生き残りのカギを握る野生宿主の同定に成功した。本研究が、植物病原菌研究における新たな発想に基づく研究モデルの開拓につながることを期待する。

研究成果の概要（英文）： In the agroecosystem, it is often experienced that new diseases occur within several years after introduction of new crop species and cultivars. Because new diseases occur at an early timing, it is thought that the pathogen did not arise by mutation after the initiation of cultivation, but has been already inhabited as a potential pathogen of wild plants.

In this study, we searched for susceptible plants other than host crops of Alternaria pathogens that produce host-specific toxins and succeeded in identifying them. The identified plants included native wild plants, demonstrating that the wild plants have been responsible for the emergence of crop diseases as initial carriers and potential hosts of the pathogens.

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 宿主特異的毒素 進化

1. 研究開始当初の背景

農業現場では、新たに育成された作物種や作物品種の導入後、数年のうちに新病害が発生し、深刻な被害を及ぼすことがしばしば経験されている。新病害が早いタイミングで発生することから、病原菌は栽培開始後に突然変異によって病原菌化したのではなく、すでに土着菌として生息していたと考えられている。潜在的病原菌は、どのようにして誕生し、宿主作物と出会うまで、病原性機能を維持しながらどこに生息しているのか？“病原菌の起源”の解明は、植物病理学分野の重要課題の一つであるが、これまでその情報は偶然の発見に期待するばかりであった。

本研究で対象とする *Alternaria alternata* は自然界に広く分布する本来腐生的な糸状菌であるが、異なる作物に感染する 7 つの病原性系統 (病原型) が存在する。これら病原型の病原性は、宿主作物にのみ毒性を示す宿主特異的毒素 [Host-specific toxin (HST)] によって決定されている (図 1) (1, 2)。したがって、7 つの病原型は、それぞれ固有の HST 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、腐生菌の病原菌化を研究するための単純かつ好適なモデルである。

申請者らは、5 つの病原型 (ナシ菌、イチゴ菌、タンゼリン菌、リンゴ菌、トマト菌) から HST 生合成遺伝子 (*TOX*) クラスターを同定し、*TOX* クラスターが生存には必要でない小型の“余分な染色体”、conditionally dispensable (CD) 染色体に座乗することを見出した (3)。さらに、CD 染色体の *TOX* 領域以外の構造が類似していることを見出し、共通起源となった染色体が存在し、各病原型の *TOX* クラスターがその染色体でそれぞれ成立したことを示唆した (1, 2)。また、CD 染色体の成立には、*TOX* の水平移動、*TOX* クラスターの重複など複雑なゲノム変異が関与している。

農業現場に導入された高品質の新品種が、土着菌の第 2 次代謝産物 (HST) にめっぽう弱かったことは不幸な偶然である。一方、*A. alternata* の CD 染色体の成立には複雑なゲノム変異が関与しており、その成立と維持には強い選択圧がかかっている。さらに、CD 染色体遺伝子の分子系統解析の結果を合わせて考えると、*TOX* クラスターと CD 染色体の起源は古く、その成立のタイムスケールは我々が知る宿主作物の栽培の歴史では短すぎる。このような CD 染色体の特徴から、HST が病原性因子として機能する、我々が気づいていない野生宿主の存在が想定された。

生存上は不要な“余分な染色体”が病原菌化をもたらしたという事実は、植物病原菌研究の歴史のなかでも重要な発見であり、その成立過程と生態的意義の解明は是非とも成し遂げたい課題である。本課題は、“言うは易く、行うは難し”の研究であるが、*A. alternata* 病原菌の素性が徐々に明らかとなり、本菌の隠された生活環の探究に挑戦すべき時を迎えた。

2. 研究の目的

A. alternata 病原菌は、HST という一つの因子を獲得することによって病原菌化した (4)。HST 生産を支える *TOX* クラスターと CD 染色体の同定によって、病原菌化の遺伝的軌跡の検証が現実的な課題となった。さらに、野生宿主の探索によって、宿主作物と出会う以前に成立した CD 染色体の生態的意義を見出すことができると考えた。本研究では、腐生菌の病原菌化をもたらした *TOX* クラスターと CD 染色体の起源についてさらに検証するとともに、潜在的病原菌の自然界での適応のカギを握る野生宿主を探索することによって、HST を介した *A. alternata* 病原菌の誕生と適応の軌跡 (病原菌の起源) の探求を目指した。リンゴと同じバラ科のボケとユスラウメが、リンゴ斑点落葉病菌の潜在的宿主であることが報告されている (5)。両植物は帰化植物であるが、この報告はバラ科自生種から本菌の野生宿主を発見できる可能性を示している。

3. 研究の方法

A. alternata 病原菌のうち、バラ科作物を宿主とするリンゴ斑点落葉病菌 (*A. alternata* apple pathotype、AM 毒素生産菌)、ナシ黒斑病菌 (*A. alternata* Japanese pear pathotype、AK 毒素生産菌) およびイチゴ黒斑病菌 (*A. alternata* strawberry pathotype、AF 毒素生産菌) を用いた (図 2)。なお、イチゴ黒斑病菌は、感受性イチゴ品種だけでなく、ナシ黒斑病感受

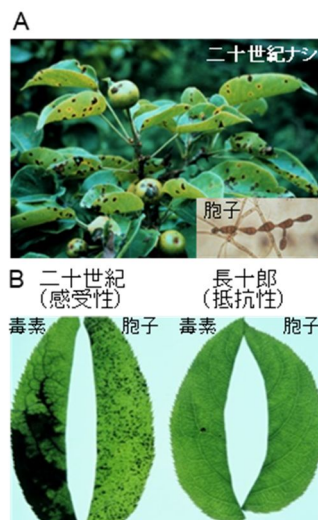


図1. (A) ナシ黒斑病. (B) ナシ黒斑病菌の AK 毒素の毒性. 毒素液を有傷処理. 孢子懸濁液を噴霧接種. 24時間後.

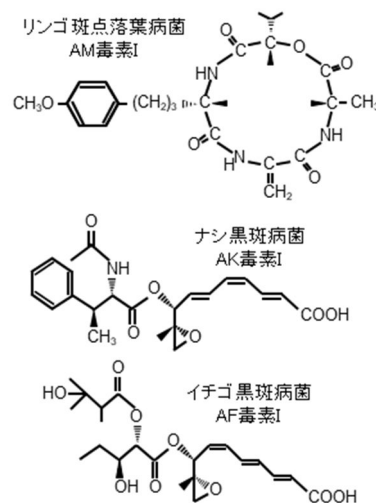


図2. 3病原菌の宿主特異的毒素.

性の二ホンナシ品種にも病原性を示すことが知られている（ ）。

(1) CD 染色体の起源染色体の探索（代表者柘植・分担者児玉）

単純に考えると、腐生的 *A. alternata* 菌株が起源となった dispensable 染色体を保有すると予想される。分担者児玉は、すでに起源染色体候補を保有する非病原性菌株を選抜していた。本研究では、起源染色体候補の塩基配列の決定、遺伝子の推定、推定遺伝子の分子系統解析によって、CD 染色体の起源となった染色体を同定するとともに、その成立機構と進化的起源について検証した。

(2) *TOX* クラスターの起源遺伝子の機能解析（代表者柘植）

TOX の分子系統解析によって、*TOX* クラスターはゲノム内での遺伝子重複と水平移動の合わせ技によって成立したことを示す結果を得た。リンゴ斑点落葉病菌では、AM 毒素生産に関与する 12 個の遺伝子 (*AMT* 遺伝子群)のうち、7 個が系統学的に離れた *Mycosphaerella* 属菌から水平移動したことが示唆された(図 3)。本研究では、*Mycosphaerella* 属菌のうちコムギ葉枯病菌 (*M. graminicola*) を用いて、*AMT* 相同遺伝子 (*MgAMT* 遺伝子) の破壊株を作出し、病原性における機能を解析した。

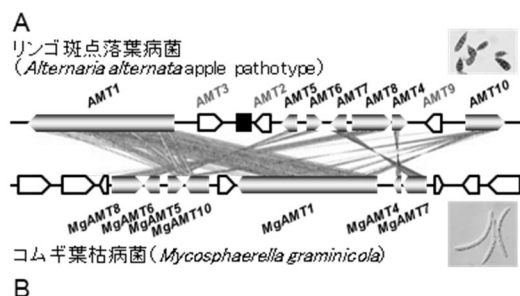


図3. (A)リンゴ斑点落葉病菌とコムギ葉枯病菌の相同遺伝子クラスター領域、(B)*Mycosphaerella*属菌における *AMT* 相同遺伝子の分布。

(3) 野生宿主の探索（代表者柘植・分担者足立、児玉）

リンゴ斑点落葉病菌の潜在的宿主であることが報告されているボケとユスラウメの各 11 品種について、それらの AM 毒素とリンゴ斑点落葉病菌に対する感受性を検定した。さらに、ボケとユスラウメの自然病斑からリンゴ斑点落葉病菌の分離を試みた。

農研機構果樹茶業部門において遺伝資源として収集保存されているリンゴ属、ナシ属の在来野生系統のリンゴ斑点落葉病菌、ナシ黒斑病菌、イチゴ黒斑病菌とそれらの毒素に対する感受性を検定し、潜在宿主を探索した。

4. 研究成果

(1) CD 染色体の起源染色体の探索（代表者柘植・分担者児玉）

腐生的 (非病原性) *A. alternata* 菌株が起源染色体を保有すると予想される。分担者児玉は、日本産、メキシコ産、ペルー産の非病原性菌株から、CD 染色体保存遺伝子を PCR によって網羅的に検出し、それぞれの 2%、8%、5%の菌株が起源染色体候補を保有することを見出した。さらに、次世代シーケンサーを用いてペルー産菌株のゲノムドラフト配列を決定し、先に同定された CD 染色体保存領域を検出した。以上の結果から、腐生的 *A. alternata* 菌株が、CD 染色体の起源となった dispensable 染色体を保有することが示唆された。

(2) *TOX* クラスターの起源遺伝子の機能解析（代表者柘植）

12 個の *AMT* 遺伝子のうち、7 個の相同遺伝子 (*MgAMT* 遺伝子) を保有するコムギ葉枯病菌 (*M. graminicola*) について、その病原性における *MgAMT* 遺伝子の機能を解析した。本菌は、培地上での成育が非常に遅く、扱いにくい菌であるが、アグロバクテリウムを用いた本菌の形質転換系を確立した。そこで、AM 毒素合成の鍵酵素であるリボソーム非依存性ペプチド合成酵素をコードする *AMT1* の相同遺伝子 *MgAMT1* の遺伝子破壊を試みた。



図4. コムギ葉枯病菌の *MgAMT1* 変異株の病原性。噴霧接種15日後。

MgAMT1 破壊ベクターを保有するアグロバクテリウムを用いて 200 株の形質転換体を分離し、これら形質転換体から 2 株の遺伝子破壊株の同定に成功した。さらに、野生株と破壊株のコムギに対する病原性を検定し、破壊株が野生株と同様に病徴を引き起こすこと、すなわち *MgAMT1* が病原性に関与しないことを明らかにした(図 4)。また、破壊株の孢子形成、栄養生長なども野生株と有意な差は認められず、*MgAMT1* がこれら形質に関与しないことが判明した。以上の結果から、コムギ葉枯病菌では病原性に関与しなかった遺伝子(群)が、*A. alternata* に水平移動し、新たに AM 毒素の生産に利用され、病原性進化に活用されたことが示唆された。

(3) 野生宿主の探索（代表者柘植・分担者足立、児玉）

ボケとユスラウメのリンゴ斑点落葉病菌に対する感受性

先述したように、リンゴと同じバラ科のボケとユスラウメがリンゴ斑点落葉病菌に感受性であることが報告されている（ ）。そこで、ボケ 11 品種とユスラウメ 11 品種について、リンゴ斑点落葉病菌と AM 毒素に対する感受性を検定した。なお、リンゴ斑点落葉病菌に対する感受性は、本菌の孢子接種によって評価した。その結果、ボケでは花色の白またはピンク系統、ユスラウメでは花色の白系統が斑点落葉病菌と AM 毒素に高い感受性を示すことが確認された（図 5）。さらに、本菌の GFP 発現株の孢子を用いて、ボケとユスラウメの葉への感染行動を観察したところ、本菌の孢子は抵抗性品種、感受性品種のどちらの葉上でも正常に発芽し、付着器を形成したが、感受性品種の表皮細胞にのみ侵入し、細胞内に蔓延することが観察された。以上の結果から、ボケとユスラウメにも感受性と抵抗性の系統が存在することが明らかとなった。

ボケとユスラウメが、リンゴ斑点落葉病菌の自然宿主であれば、両植物に発生した自然病斑から、本菌が分離されるはずである。ボケとユスラウメの葉に発生した斑点性の自然病斑（図 6）を多数採取し、病斑から菌を分離した。分離菌のうち、孢子形態から *Alternaria* 属菌と同定された菌株について、AM 毒素生産性と感受性リンゴ品種に対する病原性を検定した。その結果、ボケとユスラウメどちらの自然病斑からも、AM 毒素を生産し、ボケやユスラウメだけでなく、リンゴにも病原性を示す菌株が分離された。さらに、それら菌株が AM 毒素生産遺伝子を保有することを PCR によって確認した。以上の結果から、ボケとユスラウメが本菌の自然宿主であることが明らかとなった。なお、ボケとユスラウメのナシ黒斑病菌、イチゴ黒斑病菌、それぞれの毒素に対する感受性を検定したところ、供試したすべての品種が両病原菌に抵抗性であった。

ユリノキのリンゴ斑点落葉病菌に対する感受性

研究分担者の児玉から、鳥取大学構内に植栽されているユリノキの葉に AM 毒素を処理したところ、壊死が引き起こされた記録があるとの情報提供があった。ユリノキはモクレン科である。そこで、ユリノキ葉に AM 毒素を処理したところ、感受性リンゴ葉と同様に壊死が引き起こされた。さらに、孢子接種によって病斑が形成され、ユリノキもリンゴ斑点落葉病菌の潜在宿主であることが示唆された。

リンゴ属とナシ属の在来野生系統のリンゴ斑点落葉病菌、ナシ黒斑病菌およびイチゴ黒斑病菌に対する感受性

農研機構果樹茶業部門において遺伝資源として収集保存されているリンゴ属 22 系統（10 県由来）とナシ属 46 系統（5 県由来）について、リンゴ斑点落葉病菌、ナシ黒斑病菌、イチゴ黒斑病菌に対する感受性を孢子接種によって検定した。その結果、リンゴ斑点落葉病菌に感受性のリンゴ属 8 系統とナシ属 4 系統、ナシ黒斑病菌とイチゴ黒斑病菌の両菌に感受性のナシ属 1 系統が見出された。さらに、これら系統がそれぞれの病原菌の毒素に感受性であることを確認した（図 7）。

今回供試した系統は、従来からの在来品種、保存系統ではなく、山林原野、農家の庭先等で自生していた野生系統である。したがって、在来のリンゴ属、ナシ属にこれら病原菌に感受性の野生系統が存在すること、すなわち感受性の作物品種が栽培される以前から、自然界に潜在宿主が存在していたことが明らかとなった。

これら系統の地理的由来については、文献記載が

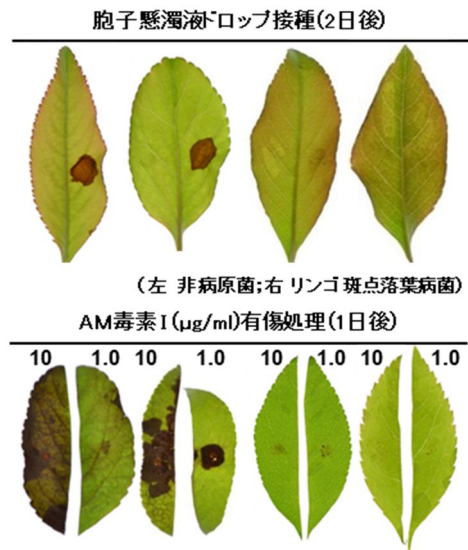


図5. ボケ4品種のリンゴ斑点落葉病菌とAM毒素に対する感受性。



図6. ボケとユスラウメの自然病斑。

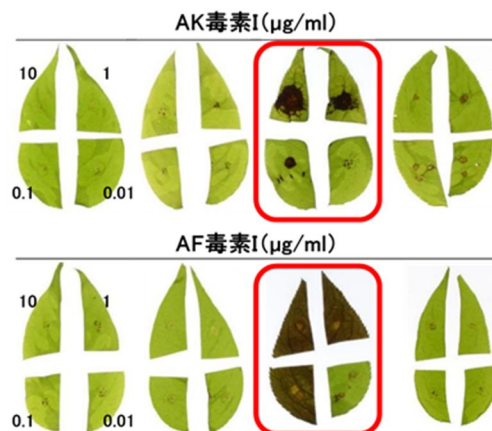


図7. ナシ属4系統のナシ黒斑病菌のAK毒素およびイチゴ黒斑病菌のAF毒素に対する感受性。有傷処理1日後。

ある(,)。今後、自生植物における病害発生調査と自然病斑からの病原菌の分離によって、今回同定した感受性系統がそれぞれの病原菌の自然宿主であることを実証したい。

<引用文献>

- Tsuge T *et al.* (2012) Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol Rev* 36, 44-66.
- Tsuge T *et al.* (2016) Evolution of pathogenicity controlled by small dispensable chromosomes in *Alternaria alternata* pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol* 95, 27-31.
- Johnson L *et al.* (2001) Spontaneous loss of a conditionally dispensable chromosome from *Alternaria alternata* apple pathotype leads to loss of toxin production and pathogenicity. *Curr Genet* 40, 65-72.
- Hatta R *et al.* (2002) A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* 161, 59-70.
- Akagi Y *et al.* (2009) Horizontal chromosome transfer, a mechanism for the evolution and differentiation of a plant-pathogenic fungus *Eukaryot Cell* 8, 1732-1738.
- 関口昭良 (1976) リンゴ斑点落葉病に関する研究. 長野県園芸試験場報告 12, 1-64.
- 池谷裕幸ら (2005) 山梨県・長野県におけるアオナシの探索・収集. 植探報 21, 37-43.
- 池谷裕幸ら (2006) 北東北地方におけるナシ属・リンゴ属の探索・収集. 植探報 22, 13-21.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 柘植尚志	4. 巻 21
2. 論文標題 植物病原菌の宿主選択性: 宿主特異的毒素生産菌を例として	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物機能開発研究所紀要	6. 最初と最後の頁 2-12
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 Tsuge, T.	4. 巻 95
2. 論文標題 Exploring the origin of crop pathogens - host-specific toxin producing pathogens as the case study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 458-462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-019-00874-6	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 柘植尚志	4. 巻 85
2. 論文標題 植物病原菌の起源を探る - 宿主特異的毒素生産菌を例として	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本植物病理学会報	6. 最初と最後の頁 171-174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3186/jjphytopath.85.171	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大石好則, 播本佳明, 八田理恵子, 新城明久, 張裕介, 間瀬千晶, 原歩美, 川瀬めぐみ, 近藤日佳理, 後藤千保, 宮川泰輝, 鈴木侑美, 森汐理, 赤木靖典, 児玉基一朗, 秋光和也, 山本幹博, 柘植尚志, 花田耕介
2. 発表標題 植物病原性糸状菌に存在するCD染色体の進化的起源の解明
3. 学会等名 植物インフォマティクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 足立嘉彦, 長谷川大士, 上野友暉, 児玉基一朗, 柘植尚志
2. 発表標題 リンゴ斑点落葉病菌のユスラウメに対する病原性
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柘植尚志
2. 発表標題 植物病原菌の起源を探る - 宿主特異的毒素生産菌を例として
3. 学会等名 日本植物病理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児玉基一朗
2. 発表標題 Alternaria属菌の病原性進化に関する研究
3. 学会等名 日本植物病理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤木靖典, 柘植尚志, 有江 力, 児玉基一朗
2. 発表標題 Alternaria alternata トマト病原型が保有する病原性染色体の起源
3. 学会等名 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柘植尚志
2. 発表標題 宿主特異的毒素の獲得による <i>Alternaria alternata</i> の病原菌化は適応進化か？
3. 学会等名 日本植物病理学会関西西部会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 コムギ葉枯病菌ゲノムに存在するリンゴ斑点落葉病菌AM毒素生成遺伝子クラスターの相同領域の機能
3. 学会等名 日本植物病理学会関西西部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本植物病理学会（一瀬勇規，大島研郎，久保康之，高野義孝，竹本大吾，柘植尚志，中屋敷均，増田税，吉田健太郎）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 264
3. 書名 植物たちの戦争 病原体との5億年サバイバルレース	

〔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 分 担 者	児玉 基一郎 (KODAMA Motoichiro) (00183343)	鳥取大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (15101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	足立 嘉彦 (ADACHI Yoshihiko) (70355387)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・ユニット長 (82111)	

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