

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580050

研究課題名（和文）

ジャガイモ疫病菌半数体菌株の遺伝学的解析

研究課題名（英文）Genetic analysis of the haploid strain in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*

研究代表者

多賀 正節 (TAGA MASATOKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80236372

研究成果の概要(和文):ジャガイモ疫病菌ではこれまで二倍体以上の倍数性が知られていたが、半数体の存在は未報告であった。本研究では、我々が新しく発見した半数体菌株について、(1)核とミトコンドリア遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析、(2)フローサイトメトリーによる DNA 含量とゲノムの安定性の解析、(3)体細胞核・染色体の顕微鏡観察、(4)生育特性の調査、(5)栄養要求性突然変異体の作出、(6)形質転換法の確立、などの遺伝学的研究を行った。

研究成果の概要(英文): Although the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, has long been believed to be diploid or of higher level of ploidy, we discovered a haploid isolate recently. In this study, we carried out genetic analyses on this isolate, including (1)molecular phylogenetic analysis based on nuclear and mitochondrial genes; (2) flow cytometric analysis of nuclear DNA content and stability of genome; (3)microscopic observation on the somatic nuclei and chromosomes; (4)growth characteristics; (5)production of auxotrophic mutants; (6)establishment of transformation method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：疫病菌・ジャガイモ・ゲノム・倍数性・*Phytophthora*・遺伝学・半数体

1. 研究開始当初の背景

1980～1990年代の顕微分光測光法による解析から、*P. infestans* は基本的には二倍体であるが、三倍体や四倍体も高頻度で存在するとされてきた。我々は平成 20 年からフローサイトメトリー (FCM) を用いて世界各地産 *P. infestans* 菌株の倍数性を解析し、半数体(一倍体)と考えられる菌株を発見した。それまで半数体の存在は卵菌類では知られていないので、これが卵菌類における最初の半数体

の例と考えられる。

半数体は遺伝学的解析には非常に有用な材料である。例えば、二倍体菌株では困難であった劣性突然変異体を用いた遺伝解析や基本ゲノムの解明など、遺伝学的に意義深い研究が可能となる。そこで本研究では、半数体菌株を用いた遺伝解析の実験系を確立するための基礎研究として、半数体菌株の遺伝的特性の解明や遺伝解析のための実験系の確立を試みることにした。

2. 研究の目的

(1)半数体菌株の分子系統解析:半数体菌株は倍数体株から生じたと思われる。遺伝子の塩基配列を用いた分子系統解析により半数体株と他の菌株との類縁関係を調べ、菌株の起原・系統を明らかにする。

(2)半数体菌株ゲノムの染色体構成・核型の解析:ゲノムの半数性は核 DNA 量からの判定であり、その染色体構成は不明である。そこで、染色体数や染色体の形態を調べて、ゲノムの染色体構成(核型)を明らかにする。

(3)半数性・倍数性の遺伝的効果の解析:半数体菌株のゲノムを倍加させて人工的に二倍体株を作成し、元株(半数体菌株)、人工二倍体菌株、野生の二倍体・三倍体株間で形質を比較して、半数性と倍数性の遺伝的効果を解析する。

(4)劣性突然変異体の作出:半数性の利点を生かして、これまでに *P. infestans* では得られていなかった栄養要求性等の劣性突然変異株を作出する。

3. 研究の方法

(1)分子系統解析

交配型とミトコンドリア DNA(mtDNA)ハプロタイプは、それぞれ Judelson ら(1995)及び Griffith ら(1998)に従って PCR-RFLP により決定した。

種間及び種内の分子系統樹作成のための塩基配列は、核 DNA として rDNA の ITS 領域、*Ras* 遺伝子、Intron1 of *Ras* (IR)を、ミトコンドリア DNA としてはリボソーム蛋白 L14 と L15(P3 と略記)、シトクロム *c* オキシダーゼ遺伝子(*cox1*)の各部分領域を用いた。各領域は PCR で増幅し、BigDye Terminator v3.1 キットでラベリングした後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて配列を決定した。

系統樹の作成は MEGA5 を用いて行った。種レベルの系統解析は、ITS、IR、*cox1* の配列を使用して近隣結合法(NJ 法)、最尤法(ML 法)、最節約法(MP 法)により系統樹を作成した。また、種内系統解析では、P3 と *cox1*、あるいは IR と *Ras* の配列を統合し、NJ 法と ML 法により系統樹を作成した。NJ 法と ML 法では木村 2 変数モデルを用いて進化的距離を計算した。MP 法では CNI をサーチレベル 1 に設定して系統樹作成を行った。

(2) フローサイトメトリー(FCM)による DNA 含量とゲノムの安定性の解析

Galbraith ら(1983)が植物用に開発した方法を *P. infestans* 用に改変して単離核の試料を作製した。すなわち、エンドウマメ煮汁液体培地で培養した菌体をカミソリ刃で細かく裁断して緩衝液中に核を放出させ、ナイロンメッシュで濾過後、ヨウ化プロピジウムで染色して FCM の測定に供試した。測定にはベックマン・コールター EPICS XL を用い、励起はアルゴンイオンレーザー (488 nm)、検出は FL-3 を使用し、データは WinMDI ver.2.9 で解析した。

半数体性の安定性を半数体菌株の保存培養株を用いて FCM で解析した。倍数性が変化し、ヘテロカリオン化した培養株については、菌糸先端部を切り取って培養する方法(菌糸先端培養)と単一プロトプラストからの再分離による方法で半数体株の再作出を行った。

(3)体細胞核・染色体の顕微鏡観察

染色体像の観察では、プロトプラストを用いる方法と微小管重合阻害剤で処理した培養菌糸中の中期像を観察する方法 (Ritch and Dagget, 1995) を試みた。また、間期核のサイズの測定は、エタノールで固定したプロトプラストを DAPI 染色し、蛍光顕微鏡で写真撮影した画像から核の面積を計測した。

(4)生育特性の調査

菌の生育度は、菌叢ディスクを各種の栄養平板培地に接種してコロニーの直径と面積を測定することにより求めた。また、細胞のサイズはエンドウマメ煮汁液体培地で培養した菌糸の長軸直径を測定して求めた。いずれも、二倍体標準菌株と比較することにより半数性の効果を推定した。

(5)栄養要求性突然変異体の作出

塩素酸カリウムを最終濃度 1~5% で添加したエンドウマメ煮汁寒天培地に菌叢ディスクを接種して培養し、出現したセクターの先端部を切り取って硝酸塩利用能欠損変異株を作出した。次いで、変異株の塩素酸抵抗性を半数体菌株と標準二倍体菌株で比較するとともに、二倍体菌株については硝酸塩還元酵素の塩基配列を決定した。

(6)形質転換法の確立

エンドウマメ煮汁液体培地で培養した菌体を酵素(ドリセララーゼ/セルラーゼ)処理して作製したプロトプラストを用い、Judelson ら(1991)の方法に準じてリポフェクチン-ポリエチレングリコール法によってプラスミド DNA(ネオマイシン抵抗性遺伝子に卵菌類由

来のプロモーターとターミネーターを接続させた発現カセットを持つpHAMT35Nを導入した。次いで、プロトプラストを液体培地で培養した後、ジェネティシン(G418)を含有する培地に撒いて、形質転換体を選抜した。形質転換体は、菌糸先端培養により純化後、PCRによりネオマイシン抵抗性遺伝子を確認した。

4. 研究成果

(1)分子系統解析

半数体菌株が*P. infestans*に属することは、*P. infestans*の他の菌株と他の種(*P. mirabilis*, *P. andina*, *P. phaseoli*, *P. ramorum*, *P. sojae*, *P. ipomoeae*)を含めた分子系統解析によって支持された(図1)。

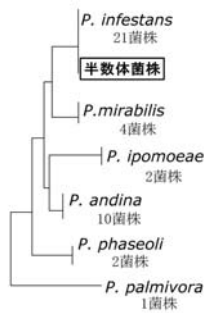


図1 種間系統図

半数体菌株のmtDNAハプロタイプはJP-2系統やUS-1系統の菌株とは異なるIaに属し、交配型はPCR-RFLPによる交配型決定法によってA2であることが判明した。

種内の分子系統解析によって、半数体菌株はメキシコ、コスタリカ、ペルー、アメリカ、アイルランドの菌株と同じクレードに属することがわかった(図2)。

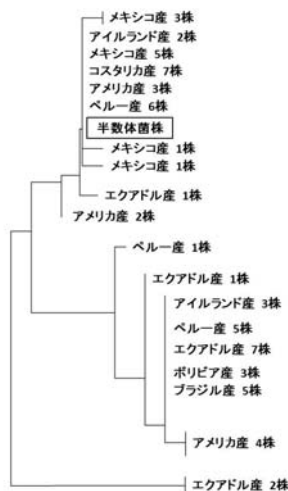


図2 種内系統図

以上の結果を総合して、半数体菌株はコスタリカ、メキシコ、ペルー産の*P. infestans*と同じ系統に属すると結論した。これは、半数体菌株がメキシコで採集された事実と符合する。今回の結果は、本菌の倍数性に関する従来の定説を覆し、半数体が存在することを実証したという点で大きい意義がある。

(2)FCM解析によるゲノムの安定性解析

半数体株(図3)の継代保存培養株10数菌株についてDNA含量をFCMで解析したところ、全株で菌糸中の二倍性核の割合は40%以上であり(最高は80%)、半数性核と二倍性核がヘテロカリオン化していることが明らかとなった(図4左)。次に、今後の研究で使用する半数体株を再び得るために、菌糸先端培養と単一プロトプラストの再生による半数性核のホモカリオン化を試み、前者では最終的に半数性核の割合が90%程度の系統を、後者では85~90%の系統を作出できた(図4右)。菌糸中の核にはG₂期の核が一定の割合で存在することを考慮すれば、これらの方法で得られた再分離系統はほぼ半数性になっていると考えられた。次に、再分離系統とヘテロカリオン化した保存株の間でITSと*Ras*の塩基配列を比較したところ、両者で2つの塩基配列が一致し、半数体菌株中での二倍性核の出現の原因としての半数性核の自然倍化の可能性が示唆された。

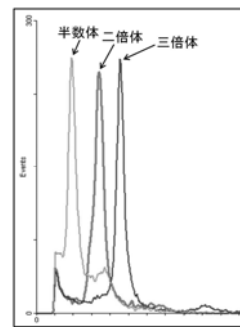


図3 半数体菌株のDNA含有量

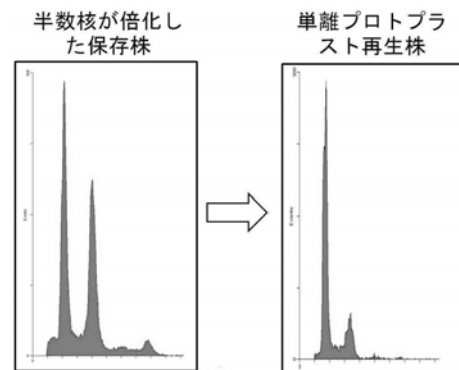


図4 半数体菌株のゲノムの安定性

以上のヘテロカリオンの菌糸体から特定の倍数性の系統を作出する実験は*P. infestans*では初めての事例であり、今回用いた手法は、今後の本菌のヘテロカリオンの遺伝的解析に貢献すると考えられる。

(3)体細胞核・染色体の顕微鏡観察

核・染色体を観察するためにプロトプラスト破裂法と微小管重合阻害剤処理による培養菌糸観察法を試み、後者の方法（液体培養菌糸にコルヒチン(0.05%)とコルセミド(1%)を同時に処理して18時間培養→カルノア液固定→リン酸緩衝液洗浄→DAPI染色）で凝縮した染色体像を得ることに成功した（図5）。ただし、個々の染色体を識別して染色体数を決定するまでには至っておらず、観察法のさらなる改良が必要である。

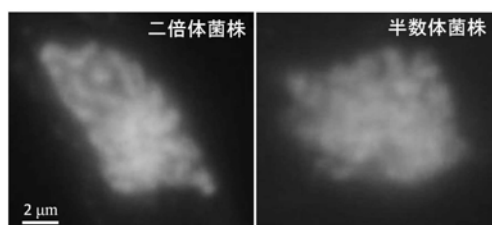


図5 観察された染色体像

間期核については、半数体菌株と二倍体及び三倍体菌株の核のサイズをスライドガラス上に展開させた核標本の面積を指標として比較し、半数体菌株の核面積の平均値は二倍体菌株の約80%であり、統計的に有意に小さい（クラスカル・ウォリス検定使用）ことがわかった（図6）。また、二倍体と三倍体間でも有意差が認められた。高等動植物では倍数性と核サイズの関係が知られているが、*P. infestans*を含めて卵菌類で実証したのはこれが初めてである。

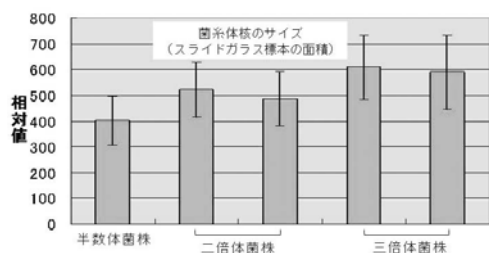


図6 倍数性と核のサイズ

(4)生育特性の調査

半数性株は遊走子嚢をほとんど形成せず、テスター株とは交配不能であった。また、pea broth agar, rye B, V8などの平板培地上での生育速度は二倍体標準株の70~80%程度（コロニー直径で測定）であった。これらの結果か

ら、植物の半数体と同様、*P. infestans*においても半数性は生育に関して負の効果をもたらすと考えられた。なお、菌糸中の核密度、細胞のサイズの指標として測定した菌糸の長軸方向の直径については、半数性の影響は認められなかった。

(5)栄養要求性突然変異体の作出

塩素酸塩(KClO₃)抵抗性を指標として栄養要求性的一种である硝酸塩利用能欠損変異体(*nit*変異株)を作出した。半数体菌株の塩素酸塩抵抗性は二倍体菌株に比べて明らかに低く、KClO₃での最適選抜濃度は半数体が1%であるのに対して、二倍体菌株は3%であった。二倍体菌株のKClO₃抵抗性は単遊走子分離株でも維持され、遺伝性であることが実証された。次いで、変異の原因遺伝子候補である*NiaA*遺伝子の塩基配列解析を二倍体菌株を用いて行い、*nit*変異体の*NiaA*は変異型対立遺伝子遺伝子と野生型対立遺伝子のヘテロ接合で、前者は塩基配列中にアミノ酸置換をもたらすトランジションタイプの置換を有することを見いだした。*nit*変異の作出と解析は本菌では初めてである。なお、硝酸塩還元経路を調べるための最少培地としては既報のすべての合成培地は不適であったので、今後の検討を要する。

(6)形質転換法の確立

形質転換に使用する再生率の高いプロトプラスト作製方法と培養方法について二倍体標準菌株を用いて検討し、再生率が約36%の系を確立した（酵素溶液はドリセラゼ(2 mg/ml)とセルラーゼオノズカ R10(2.5 mg/ml)を含む0.8 Mマンニトール、再生培地は1.2 Mマンニトールで2倍に希釈したエンドウマメ煮汁液体を使用）（図7）。次いで、リポフェクチン・ポリエチレングリコール法による形質転換系を確立し、これまでにジェネティシン抵抗性形質転換体を得ている。*P. infestans*において形質転換体を得たのは日本では初めてであり、今回確立した方法を半数体に適用することにより形質転換体を用いた人為的二倍体の作出が可能になると期待される。



図7 再生したプロトプラスト

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0件）

〔学会発表〕（計0件）

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多賀 正節 (TAGA MASATOKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80236372

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

秋野 聖之 (AKINO SEISHI)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：60202537