

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580474

研究課題名(和文) イネに寄生する糸状菌のカビ毒産生能の遺伝的要因解明

研究課題名(英文) Elucidation of genetic factors involving mycotoxin producibility in the fungus parasitic on rice

研究代表者

須賀 晴久 (Suga, Haruhisa)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・准教授

研究者番号：20283319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：イネばか苗病菌(*Fusarium fujikuroi*)の中には、ブタ肺水腫やウマ白質脳症を起こすカビ毒であるフモニシンを産生する集団と産生しない集団が存在する。本課題ではフモニシン産生能喪失の原因を遺伝子レベルで解明した。喪失の原因変異はフモニシンの生合成に関わる遺伝子クラスター中の複数の領域に分散して存在していると推定された。そのうちの1つは他のフモニシン生合成遺伝子の転写制御因子となっているFUM21遺伝子中のg.2551G>T(p.G678\*)置換であり、コードされたタンパク質のC末端側11アミノ酸が欠失することで機能を失っていると予想された。

研究成果の概要(英文)：Fusarium fujikuroi is the fungal pathogen of the rice bakanae disease. Fumonisin is a mycotoxin that causes swine pulmonary edema and equine leukoencephalomalacia. Fumonisin producing population and non-producing population are present in *F. fujikuroi*. The causative mutations are found to be dispersed in the fumonisin biosynthetic gene cluster in a fumonisin non-producing isolate. One of the mutations is a g.2551G>T(p.G678\*) substitution in FUM21 gene coding transcription factor for other fumonisin biosynthetic genes. The coding protein presumed to be disfunctioned by the missing of 11 amino acids at C-terminal derived from the substitution.

研究分野：菌学

キーワード：菌類 遺伝子 マイコトキシン イネばか苗病菌 Fusarium

## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌(カビ)が産生する有毒物質は、カビ毒と呼ばれる。世界人口が増加する中、食料のカビ毒汚染を防ぎ、安全を確保することが欠かせない。カビ毒産生菌の多くは作物の栽培中に寄生する。加熱で菌を除去できても、カビ毒自体は熱に強いために除去できないことで大きな問題となっている。そのため最も望ましい対策は、作物の栽培・保存の際、菌にカビ毒を産生させないことである。

これまでの研究で国内のイネばか苗病菌 *Fusarium fujikuroi* には、ブタ肺水腫やウマ白質脳症を起こすカビ毒のフモニシンを産生する集団と産生しない集団が存在することが判明している。これらの集団を利用してフモニシン産生能喪失の原因を遺伝子レベルで解明すれば、フモニシン産生抑制技術を確立するための標的遺伝子と部位情報を得ることができる。

## 2. 研究の目的

本課題では、イネばか苗病菌におけるフモニシン産生能喪失の原因を遺伝子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

国内で分離したイネばか苗病菌の菌株コレクション中に交配可能なフモニシン産生株と産生能喪失株が見出されている。そこで、これらの株を利用して以下のような方法でフモニシン産生能喪失の原因を解明することにした。

### (1) 候補遺伝子の探索

#### 連鎖解析

イネばか苗病菌のフモニシン産生能喪失株のフモニシン遺伝子クラスターに欠失は見られていないが、これまでに行った連鎖解析の予備試験の結果は、フモニシン産生能喪失の原因がフモニシン遺伝子クラスター、あるいはその近傍にあることを示している。まずは連鎖解析の精度を高めて、原因がフモニシン遺伝子クラスターにあることの確証を得る。

#### フモニシン遺伝子クラスターの配列比較

原因がフモニシン遺伝子クラスターにあることの確証を得られた段階でフモニシン産生株と産生能喪失株のフモニシン遺伝子クラスターの塩基配列を比較する。

#### フモニシン遺伝子クラスターの発現比較

イネばか苗病菌に近縁でフモニシンを産生するトウモロコシ赤かび病菌 *Fusarium verticillioides* の場合、遺伝子クラスター内の全 16 個の遺伝子は、フモニシンの生合成にあわせて mRNA が転写されている。イネばか苗病菌の遺伝子クラスターも遺伝子構成はトウモロコシ赤かび病菌と同様であることから、フモニシン産生株においては全 16 遺伝子の mRNA が転写されると予想される。一方、フモニシン産生能喪失株の場合、一部

の遺伝子の mRNA が転写されておらず、その結果フモニシンが産生されなくなっている可能性も考えられる。そこで、RT-PCR でフモニシン産生株とフモニシン産生能喪失株の発現比較を行う。

これらの結果をもとにフモニシン産生能喪失の原因となっている遺伝子候補を探し出す。

### (2) 遺伝子導入によるフモニシン産生能の回復

候補となった遺伝子について、組換え DNA 技術による遺伝子導入(プラスミドベクターを用いた糸状菌の形質転換)を利用してフモニシン産生株の正常遺伝子をフモニシン産生能喪失株へ導入し、フモニシン産生能が回復する遺伝子を明らかにする。その遺伝子中複数の変異が見られる場合は、個々の変異を人工的に導入した遺伝子を作成し、上記同様、遺伝子導入によるフモニシン産生能の回復試験により原因変異を特定する。

## 4. 研究成果

### (1) 候補遺伝子の探索

#### 連鎖解析

フモニシン産生能が喪失の原因がフモニシン遺伝子クラスターに存在する確証を得るため、交配子孫株を 100 株得て連鎖解析に用いた。これらはフモニシン産生能を持つものが 81 株、持たないものが 19 株であった。フモニシン遺伝子クラスター内の 2 つのマーカを含め、ゲノム上の 7 つのマーカでデータを取得したところ、58 株については交配に用いたいずれかの親株とデータが一致し、それらは交配子孫株を得た際に混入した親株の分生胞子に由来した株と予想された。そこでそれらを除いた 42 株を用いて連鎖解析を行った結果、フモニシン遺伝子クラスター内のマーカがフモニシン産生能と完全連鎖していることが確認された。

#### フモニシン遺伝子クラスターの配列比較

フモニシン産生株では約 50Kbp からなるフモニシン遺伝子クラスター的全塩基配列が解読されていた。そこで新たにフモニシン産生能喪失株のフモニシン遺伝子クラスター的全塩基配列を解読してフモニシン産生株との違いを調べた。その結果、フモニシン産生能喪失株のフモニシン遺伝子クラスターにはフモニシン産生株のものと同様の構造が見られたが、各遺伝子には塩基配列で 0.3-1.6%、アミノ酸配列で 0.2-2.7% の違いが検出された。

#### フモニシン遺伝子クラスターの発現比較

解読された塩基配列をもとに、それぞれのフモニシン遺伝子に対応した 16 ペアの RT-PCR 用プライマーを設計した。フモニシン産生を誘導する GYAM 液体培地により、フモニシン産生株とフモニシン産生能喪失株をそれぞれ培養して RNA を抽出した。その際、フモニシン産生株の場合は培養液中にフモニシンが検出されるのに対し、フモニシン産

生能喪失株の場合はフモニシンが検出されないことを確認した。RT-PCRの結果、フモニシン産生株については、16種類の遺伝子全てについて予想サイズのRT-PCR産物が検出された。一方、フモニシン産生能喪失株では6種類の遺伝子については予想サイズのRT-PCR産物が検出されたが、10種類の遺伝子についてはRT-PCR産物が検出されなかった(図1)。



図1. フモニシン遺伝子クラスター中の遺伝子の位置と読取り枠の方向を矢印で示した。フモニシン産生誘導GYAM液体培地で培養した際にRT-PCRで陽性だった遺伝子に(+), 陰性だった遺伝子に(-)を付した。

以上の結果をもとに、フモニシン遺伝子クラスター中の唯一の転写制御因子で、g.2551G>T(p.G678\*)の塩基置換が検出されたFUM21を原因候補遺伝子と予想した。(2)遺伝子導入によるフモニシン産生能の回復

原因候補遺伝子としたFUM21領域をフモニシン産生株からクローニングして、形質転換でフモニシン産生能喪失株に導入したが、フモニシン産生能の回復は認められなかった。また、同様にFUM6~FUM13領域を導入した形質転換体でもフモニシン産生能の回復は認められなかった。しかし、FUM6~FUM13領域の形質転換体にFUM21領域を追加導入した形質転換体を作成したところ、フモニシン産生能の回復が認められた。従って、フモニシン産生能喪失の原因変異はFUM21とFUM6~FUM13領域に分散して存在すると考えられた。フモニシン産生能喪失株のFUM21に見られているg.2551G>T(p.G678\*)置換はコードしているタンパク質のC末端側11アミノ酸を欠失させることになる(図2)。

MTEP1VFVEDNPAGVDSGHKPRFRRRGACESCRRKRVRCNGSNPNQDQKSS1DCQYKASSIKITNDGTYTERGSPSEPLP 80  
MTEP1VFVEDNPAGVDSGHKPRFRRRGACESCRRKRVRCNGSNPNQDQKSS1DCQYKASSIKITNDGTYTERGSPSEPLP 80

(途中省略)

RKETRYGSLTSMGIAI GLFSRLSLDIDVPDVEVTELGKLRQIMKCO 668  
RKETRYGSLTSMGIAI GLFSRLSLDIDVPDVEVTELD..... 677

図2. フモニシン産生Gfc0825009株(上段)とフモニシン産生能喪失Gfc0801001株(下段)のFUM21のアミノ酸配列。

そこで、先の実験でフモニシン産生株のFUM21領域を追加導入するとフモニシン産生能が回復したFUM6~FUM13領域の形質転換体に、フモニシン産生株のFUM21領域を人工的な点変異導入でg.2551G>T(p.G678\*)に改変して追加導入してみたところ、フモニシン産生能の回復が認められなかった。

以上の結果からFUM21中のg.2551G>T(p.G678\*)がフモニシン産生能喪失の原因変異の一つであることを明らかにした。5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 13 件)

Suga H, Kitajima M, Nagumo R, Tsukiboshi T, Uegaki R, Nakajima T, Kushiro M, Nakagawa H, Shimizu M, Kageyama K, Hyakumachi M, A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1 gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese *Fusarium fujikuroi*. Fungal Biology, 査読有, 118, 2014, 402~412. DOI:10.1016/j.funbio.2014.02.005. Epub 2014 Mar 7.

須賀晴久, 主要な植物病原性 *Fusarium* 菌の種分類の現状と簡易菌種同定法の利用例. 植物防疫, 査読無, 68, 2014, 269~273.

Ishiguro Y, Otsubo K, Watanabe H, Suzuki M, Nakayama K, Fukuda T, Fujinaga M, Suga H, Kageyama K, Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. Journal of General Plant Pathology, 査読有, 80, 2014, 423~429. DOI: 10.1007/s10327-014-0520-8

Li M, Ishiguro Y, Otsubo K, Suzuki H, Tsuji T, Miyake N, Nagai H, Suga H, Kageyama K, Monitoring by real-time PCR of three water-borne zoosporic *Pythium* species in potted flower and tomato greenhouses under hydroponic culture systems. European Journal of Plant Pathology, 査読有, 140, 2014, 229~242. DOI: 10.1007/s10658-014-0456-z

Rahman MZ, Mukobata H, Suga H, Kageyama K, *Phytophthora asiatica* sp. nov., a new species causing leaf and stem blight of kudzu in Japan. Mycological Progress, 査読有, 13, 2014, 759~769. DOI:10.1007/s11557-014-0959-1

Rahman MZ, Uematsu S, Coffey MD, Uzuhashi S, Suga H, Kageyama K, Re-evaluation of Japanese *Phytophthora* isolates based on molecular phylogenetic analyses.

Mycoscience, 査読有, 55, 2014, 314~327. DOI:10.1016/j.myc.2013.11.005

Rahman MZ, Uematsu S, Takeuchi T, Shirai K, Ishiguro Y, Suga H, Kageyama K, Two new species, *Phytophthora nagaii* sp. nov. and *P. fragariaeifolia* sp. nov., causing serious diseases on rose and strawberry in Japan. Journal of General Plant Pathology, 査読有, 80, 2014, 348~365. DOI:10.1007/s10327-014-0519-1

Baten MA, Asano T, Motohashi K, Ishiguro Y, Rahman MZ, Inaba S, Suga H, Kageyama K, Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species, and

re-evaluation of *Phytophthora fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress*, 査読有, 13, 2014, 1145 ~ 1156. DOI: 10.1007/s11557-014-1003-  
Suga H, Hirayama Y, Morishima M, Suzuki T, Kageyama K, Hyakumachi M, Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*. *Plant Disease*, 査読有, 97, 2013, 619 ~ 625. DOI:10.1094/PDIS-07-12-0663-RE  
Li M, Inada M, Watanabe H, Suga H, Kageyama K, Simultaneous detection and quantification of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and distribution analyses in strawberry greenhouses by duplex real-time PCR. *Microbes and Environments*, 査読有, 28, 2013, 195 ~ 203. DOI: 10.1264/j sme2. ME12177  
Ishiguro Y, Asano T, Otsubo K, Suga H, Kageyama K, Simultaneous detection by multiplex PCR of the high-temperature-growing *Pythium* species: *P. aphanidermatum*, *P. helicoides* and *P. myriotylum*. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 79, 2013, 350 ~ 358. DOI: 10.1007/s10327-013-0466-2  
Aoki T, Tanaka F, Suga H, Hyakumachi M, Scandiani M M, O' Donnell K, *Fusarium azukicola* sp. nov., a novel exotic azuki bean root-rot pathogen in Hokkaido, Japan. *Mycologia*, 査読有, 104, 2012, 1068 ~ 1084. DOI: 10.3852/11-303  
Hashimoto Y, Fukukawa S, Kunishi A, Suga H, Richard F, Sauve M, Selosse M-A, Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. 査読有, 195, 2012, *New Phytologist*, 620 ~ 630, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04174.x

[学会発表](計 13 件)

Elkot Gabr A., Elsharkawy Mohsen M., 船坂美佳, 清水将文, 景山幸二, 百町満朗, 須賀晴久, エジプトのイネから分離された *Fusarium fujikuroi* 種複合体の菌種構成とジベレリン及びフモニシン産生. 日本植物病理学会大会, 2015年3月29日, 明治大学(東京都千代田区)  
長坂拓弥, 新井満大, 北嶋美葉, 景山幸二, 清水将文, 百町満朗, 須賀晴久, *Fusarium fujikuroi* に見られるジベレリン産生力の違いの原因マッピング. 日本植物病理学会大会, 2015年3月29日, 明治大学(東京都千代田区)

須賀晴久, 船坂美佳, 景山幸二, 清水将文, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* のフモニシン産生能喪失に関わる FUM21 遺伝子中の変異. 第76回日本マイコトキシ学会学術講演会, 2015年2月6日, 千葉大学(千葉県千葉市)  
須賀晴久, 新井満大, 瀧瀬康子, 船坂美佳, 豎石秀明, 清水将文, 景山幸二, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* におけるフモニシン産生株と非産生株のジベレリン産生性の違い. 日本植物病理学会西部会, 2014年9月27日, 富山大学(富山県富山市)  
須賀晴久, 船坂美佳, 清水将文, 景山幸二, 百町満朗, イネ種子から分離された小型分生孢子連鎖状形成 *Fusarium* 属菌の種とフモニシン産生能. 日本菌学会58回大会, 2014年6月15日, サイエンスヒルズこまつ(石川県小松市)  
須賀晴久, 船坂美佳, 清水将文, 景山幸二, 百町満朗, ムギ類赤かび病菌における FGSG02810 遺伝子破壊による病原性と子のう殻形成能の喪失. 日本植物病理学会大会, 2014年6月2日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)  
須賀晴久, スコット暁子, 小林弘典, 景山幸二, 清水将文, 百町満朗, 遺伝子導入による *Fusarium fujikuroi* G 系統株のフモニシン産生能の回復. 第74回日本マイコトキシ学会学術講演会, 2014年1月10日, 麻布大学(神奈川県相模原市)  
須賀晴久, スコット暁子, 景山幸二, 北嶋美葉, 清水将文, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* のG系統株に見出されたフモニシン産生遺伝子クラスターの部分欠失と FUM 遺伝子の発現異常. 第73回日本マイコトキシ学会学術講演会, 2013年9月13日, 大阪府立大学(大阪府羽曳野市)  
須賀晴久, 新井満大, 船坂美佳, 清水将文, 景山幸二, 百町満朗, 国内分離株に見られる *Fusarium fujikuroi* の2系統と国外分離株との関係. 日本植物病理学会西部会, 2013年9月26日, 岡山大学(岡山県岡山市)  
須賀晴久, 船坂美佳, 深澤恵海, 新井満大, 清水将文, 景山幸二, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* に見出されたイネばか苗病を起こさない系統. 日本植物病理学会, 2013年3月27日, 岐阜大学(岐阜県岐阜市)  
山口竜央, スコット暁子, 景山幸二, 百町満朗, 須賀晴久, *Fusarium fujikuroi* に見られるフモニシン非産生株のフモニシン産生遺伝子クラスター領域の構造. 第72回日本マイコトキシ学会学術講演会, 2013年1月11日, 東京家政大学(東京都板橋区)  
須賀晴久, 北嶋美葉, スコット暁子, 船坂美佳, 景山幸二, 百町満朗, *Fusarium fujikuroi* におけるフモニシン非産生の

原因マッピング. 日本植物病理学会関西  
部会, 2012年9月27日, とりぎん文化会  
館(鳥取県鳥取市)

須賀晴久, 船坂美佳, 景山幸二, 百町満  
朗, 平八重一之, チオファネートメチル  
耐性ムギ類赤かび病菌のトリコテセン系  
マイコトキシン産生に対するテブコナゾ  
ールの影響について. 第71回日本マイコ  
トキシン学会学術講演会, 2012年7月6  
日, 沖縄県市町村自治会館(沖縄県那覇  
市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

須賀 晴久 (SUGA HARUHISA)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センタ  
ー・准教授

研究者番号: 20283319