

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660035

研究課題名(和文) イネばか苗病菌の内生菌としての潜在能力とジベレリンを介した病原菌化

研究課題名(英文) Gibberellin-mediated pathogenicity of the rice bakanae pathogen *Fusarium fujikuroi*

研究代表者

柘植 尚志 (Tsuge, Takashi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30192644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネばか苗病菌(*Fusarium fujikuroi*)は、ジベレリン(主にGA3)を生産し、イネに徒長症状を引き起こす。GA3の前駆物質であるGA4とGA7はGA3よりもホルモン活性が高い。ばか苗病菌のGA生合成遺伝子*des*またはP450-3の遺伝子破壊によって、主にGA4、GA7を生産する変異株を作出した。これら変異株は野生株よりも激しい徒長症状を引き起こすことを見出し、両遺伝子の機能によって本菌の病原力が抑制されていることを明らかにした。また、トマト植物から分離された*F. fujikuroi*から、GA3を生産し、イネに徒長症状を引き起こす菌株を見出し、本菌の宿主範囲が広いことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：The rice bakanae pathogen, *Fusarium fujikuroi*, produces gibberellin (mainly GA3) and causes overgrowth (bakanae) symptom in rice seedlings. GA4 and GA7, the intermediates in GA3 biosynthesis of *F. fujikuroi*, show higher plant hormone activity than GA3. We made *F. fujikuroi* mutants, which mainly produce GA4 or GA7, by the disruption of GA biosynthetic genes *des* or P450-3, respectively. The both mutants caused bakanae symptom more severely than the wild type, indicating that these genes act to reduce virulence of this pathogen. We found *F. fujikuroi* isolates, which produced GA3 and caused bakanae symptom in rice seedlings, from endophytic isolates collected from healthy tomato plant tissues. This result suggests that the rice bakanae fungus can infect plants other than rice.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネばか苗病菌 ジベレリン 病原性 内生菌

1. 研究開始当初の背景

イネばか苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*, 完全世代 *Gibberella fujikuroi* MP-C) は、イネに特徴的な徒長症状 (ばか苗症状) を引き起こす種子伝染性の病原菌である。本菌が感染した種子を育成すると、徒長、黄化症状を示し、重症株は枯死する。特徴的な徒長症状は、本菌が感染組織中で生産するジベレリン (GA、主に GA₃) によって引き起こされる。

GA は、茎の伸長、花芽形成、種子発芽などに関わる植物ホルモンとして広く知られているが、その生産が最初に確認されたのはイネばか苗病菌である。ばか苗病菌の GA 生合成の遺伝子機構については、ドイツの Tudzynski らのグループによって精力的な研究が展開され、GA 生合成に必要な 7 個の遺伝子 (*P450-1*, *P450-2*, *P450-3*, *P450-4*, *des*, *ggs2* および *cps/ks*) が約 18 kb の領域にクラスターとして存在することが明らかにされている (図 1)。

研究代表者は、本菌の GA 生合成遺伝子のひとつ *P450-1* (生合成の初期段階を触媒するチトクロム P450 をコードする) の遺伝子破壊によって活性のある GA を生産しない GA 欠損 (GA⁻) 株を作出した。野生株と GA⁻ 株をイネ種子に接種したところ、野生株が顕著な徒長・黄化症状を引き起こしたのに対して、GA⁻ 株は全く病徴を引き起こさず、GA が病徴発現に不可欠であることが確認された。なお、GA⁻ 株の培地上での成育、コロニー形態、胞子形成能力は正常であり、GA は本菌の成育や形態形成には関与しない。また、GA⁻ 株は病徴を引き起こさないが、イネ組織への侵入、定着能力を保持していることを確認した。野生株接種によって徒長した苗においても、感染初期には組織内での菌の定着は局所的で、本菌の侵入力、組織内での蔓延能力が予想以上に低いことを見出した。

健全な各種作物から、GA を生産しない内生 *F. fujikuroi* が比較的高頻度で分離されることが報告されており、イネばか苗病菌が他の植物にも感染できる可能性が考えられた。そこで、ばか苗病菌胞子を混合した汚染土に非宿主作物 (オオムギ、メロン、トマト、ダイズ、エンドウ) の種子を播種し、感染能力を検定した。その結果、すべての作物に徒長症状が引き起こされること (図 2)、汚染土で発芽させた種子を非汚染土に移植した場合にも同様に徒長が引き起こされること、一方、幼苗の根を高濃度の胞子懸濁液に浸根接種

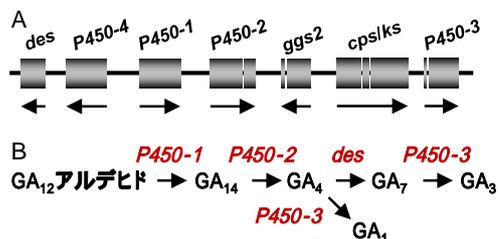


図1. (A)イネばか苗病菌のGA生合成遺伝子クラスター. (B)各遺伝子が関与する代謝段階.

した場合には、イネにも全く徒長が引き起こされないことを観察した。以上の結果は、本菌がイネ以外の作物にも、それらの種子発芽時には感染できる、本来、宿主範囲の広い内生菌であることを示唆している。したがって、本菌は病原菌誕生のひとつの道筋と予想される“内生菌の病原菌化”を実証するための有効なモデルであると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ばか苗病菌とその GA 生合成遺伝子変異株、さらにトマトから分離された内生 *F. fujikuroi* を用いて、“ばか苗病菌は内生菌が GA 生産性を獲得することによって病原菌化した”という仮説の検証を試みた。

研究を開始するに当たり、実験材料として、イネばか苗病菌から産生 GA 分子種が異なる各種変異株を作出したところ、本菌の GA を介した病原菌化現象を研究する上で極めて興味深い現象が見出された。GA₃ 生合成の最終段階またはその前段階をそれぞれ触媒する酵素遺伝子 *P450-3*, *des* (図 1) の変異により病原力が増強すること、すなわち両遺伝子の機能によって本菌の病原力が抑制されていることが判明した。そこで、複数の菌株から同様な変異株を作出し、両遺伝子の植物感染における機能を詳細に解析した。

先に研究代表者は、*F. oxysporum* 病原菌から病原性に不可欠な転写制御因子をコードする *FLOW2* を同定した。ばか苗病菌から *FLOW2* 相同遺伝子 (*FfFLOW2*) を単離し、その変異株を作出したところ、変異株はイネに



図2. イネばか苗病菌汚染土壌で育成したイネ、ダイズ、メロン、トマト. GA⁻ 株, *P450-1* 変異株.

全く徒長症状を引き起こさないことを見出した。そこで、*FfFOW2* の GA 生合成と病原性における機能についても解析した。

3. 研究の方法

(1) 3 株の日本産ばか苗病菌 (AFM06-014A 株、APF06-084A および中田 gf 株) の GA 生合成遺伝子クラスターの塩基配列を決定し、すでに構造が報告されていた台湾産菌株も含め、これら菌株のクラスター構造を比較した。

(2) 病原力が異なる AFM06-014A 株、中田 gf 株および APF06-0083 から、*P450-1*、*P450-2*、*des* または *P450-3* の遺伝子破壊によって、それぞれ異なる GA 分子種を生産する変異株を作出し、それらの病原力を比較した。病原力の検定には孢子懸濁液への種子浸漬法を用いた。イネ品種短銀坊主の種子を孢子懸濁液に浸漬した後、寒天培地または育苗土に植え付け育成し、経時的に草丈を測定するとともに、他の外部病徴 (黄化、枯れ症状など) を観察した。また、LC-MS/MS 解析によって感染植物中に蓄積している GA 分子種を検出・定量した。

各変異株に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入し、GFP 発現株を作出した。GFP 発現株を接種した苗を寒天培地で育成し、蛍光顕微鏡を用いてイネ組織中での菌の感染行動を経時的に観察した。

(3) 健全トマトから内生菌として分離された 2 株の *F. fujikuroi* をイネに接種し、徒長誘発活性を検定した。また、LC-MS/MS 解析によって感染植物中に蓄積している GA 分子種を検出・定量した。さらに、両菌株の GA 生合成遺伝子クラスターの塩基配列を決定し、イネ分離株と比較した。

(4) ばか苗病菌から *FOW2* 相同遺伝子 (*FfFOW2*) を単離した。*FfFOW2* の遺伝子破壊によって変異株を作出し、GA 生産性と病原力を検定した。

4. 研究成果

(1) 3 株の日本産菌株の GA 生合成遺伝子クラスターの塩基配列を決定し、既に報告されている台湾産菌株も含め、菌株間でクラスターの構造を比較した。その結果、4 株の GA 生合成遺伝子クラスターは、遺伝子の配列順、コード鎖、エクソン・イントロン構造が同様に、遺伝子と遺伝子間領域の配列もほぼ一致し、高度に保存されていることが明らかとなった。この結果は、GA 生産性が本菌の自然界での Fitness に重要な役割を果たしていることを示唆した。

(2) 本菌の GA 生合成の最終産物は GA_3 であるが、その中間代謝産物である GA_4 と GA_7 、 GA_4 のシャント産物である GA_1 も活性型ジベレリンであり、 GA_4 と GA_7 は GA_3 よりも高い

活性を示す (図 1)。本研究では、AFM-06-014A 株から GA 生合成遺伝子のうち *P450-1*、*P450-2*、*des*、*P450-3* それぞれの遺伝子破壊株、*des* と *P450-3* のダブル破壊株を作出し、それらの病原力を比較した。イネ種子を野生株 (GA_3 生産株)、 $\Delta P450-1$ 株 (GA 非生産株)、 $\Delta P450-2$ 株 (GA_{14} 生産株)、 Δdes 株 (GA_1 および GA_4 生産株)、 $\Delta P450-3$ 株 (GA_7 生産株)、 $\Delta des/\Delta P450-3$ 株 (GA_4 生産株) の孢子懸濁液に浸漬した後、寒天培地と培養土で育成した。その結果、予想通り $\Delta P450-1$ 株と $\Delta P450-2$ 株は徒長を引き起こさなかったが、 Δdes 株、 $\Delta P450-3$ 株、 $\Delta des/\Delta P450-3$ 株は、野生株に比べ顕著な徒長を引き起こし、病原力が向上していることが明らかとなった (図 3)。

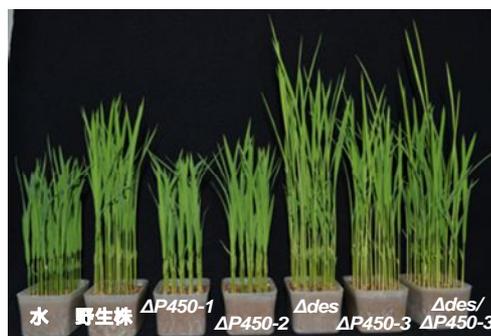


図3. GA 生合成遺伝子変異株のイネに対する徒長誘発活性。培養土で育成18日後。

野生株と各変異株の接種イネにおけるジベレリン含量を定量した。その結果、 $\Delta P450-1$ 株または $\Delta P450-2$ 株接種イネからは、活性型ジベレリンは検出されなかった。一方、野生株接種イネからは GA_3 、 Δdes 株接種イネからは GA_4 とそのシャント産物である GA_1 、 $\Delta P450-3$ 株接種イネからは GA_7 とその前駆物質である GA_4 、 $\Delta des/\Delta P450-3$ 株接種イネからは GA_4 がそれぞれ主な分子種として検出され、これら変異株接種イネには、野生株接種イネと比較して、大量の活性型ジベレリンが蓄積していることが判明した。

さらに、AFM-06-014A 株よりも病原力の強い中田 gf 株と APF-06-084 菌株から Δdes 株、 $\Delta P450-3$ 株をそれぞれ作出し、それらの病原力を検定した。その結果、両菌株由来の Δdes 株と $\Delta P450-3$ 株は、親株よりも顕著な徒長を引き起こすことに加え、種子の出芽不良と出芽後の枯死を高頻度で引き起こした。 Δdes 株、 $\Delta P450-3$ 株の接種イネでは約 70% が枯死した。以上の結果は、イネばか苗病菌では、生合成の最終段階またはその前段階の触媒酵素をそれぞれコードする *P450-3*、*des* の機能によって、活性型ジベレリンの生産量が抑制され、その結果、病原力が抑制されていることを示した。

イネ種子を GFP 発現野生株と各変異株の孢子懸濁液に浸漬した後、寒天培地に播種、育成し、菌の感染行動を蛍光顕微鏡で観察した。播種後 3 日目には、どの菌株を接種したイネでも、菌は種子の発芽部位、特に発芽時に露出した胚乳部で増殖し、隣接する茎、根

に局在していた。播種後6日目、9日目にも、GFP 蛍光の局在に顕著な違いが認められず、菌が種子内、茎、根にほとんど進展しないことが明らかとなった。また、菌株間で菌の増殖程度に顕著な差は認められなかった。以上の結果は、本菌はイネ組織内での増殖能力が低いこと、また活性型ジベレリン生産の有無、産生ジベレリン分子種の違いが菌の定着、増殖能力には顕著に影響しないことを示した。

(3) 農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センターの今崎伊織氏は、茨城県石岡市で採取した畑土壌でトマトを栽培し、多数の内生 *Fusarium* 属菌を分離した。比較的高頻度で *F. fujikuroi* が分離されることを確認するとともに、分離菌からトマトに成育促進効果を示す2株を見出した。本研究では、これら2株のトマト分離株の分譲を受け、イネに対する病原力、GA 生産性などをイネ分離株と比較した。

イネ種子を2株のトマト分離株の胞子懸濁液に浸漬した後、寒天培地で育成したところ、どちらの菌株もイネに徒長症状を引き起こした(図4)。しかしながら、トマト分離株はイネ分離株ほど顕著な徒長を引き起こさず、トマト分離株の徒長誘発能力は低いことが明らかとなった(図4)。

トマト分離株とイネ分離株を接種したイネに蓄積した GA を LC-MS/MS によって検出・定量した。その結果、量的にはイネ分離株接種イネより若干少量ではあるが、トマト分離株接種イネからも GA₃ を含む複数の GA 分子種が検出され、トマト分離株がイネ組織中で GA を生産していることが明らかとなった。以上の結果は、トマト分離株がイネばか苗病菌であることを示し、ばか苗病菌が本来宿主範囲の広い内生菌であることをさらに示唆した。

トマト分離株から GA 生合成酵素遺伝子領域を PCR 増幅したところ、ばか苗病菌と同様に約 18 kb 領域に分布する 7 個の遺伝子が検出された。それらの塩基配列を決定し、イネ分離株の GA 生合成遺伝子クラスターと構造を比較した。その結果、遺伝子の配列順、コード鎖、エクソン・イントロン構造は同様

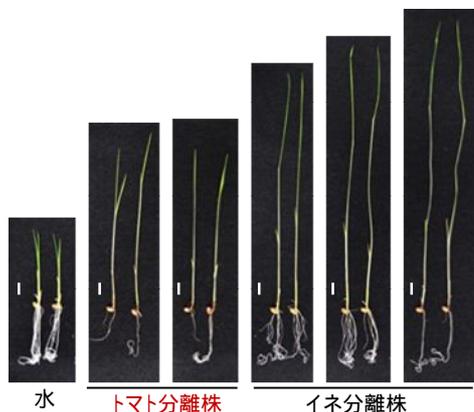


図4. トマト分離株とイネ分離株のイネに対する徒長誘発活性。寒天培地で育成18日後。バーは1 cm。

であったが、遺伝子間領域の一部欠失、遺伝子と遺伝子間領域に複数の SNPs が検出され、ジベレリンを生産する *F. fujikuroi* における系統分化が示唆された。

(4) *F. oxysporum* 病原菌の病原性に不可欠な *FLOW2* は、転写制御因子をコードし、その変異株は根への侵入能力、植物組織中での定着能力を失う。一方、栄養成長、胞子形成能力などは正常であることから、病原性に直接関与する遺伝子の発現を制御すると考えられている。イネばか苗病菌のゲノム配列から相同遺伝子 (*FfFLOW2*) を検出し、*FfFLOW2* 破壊株を作出した。 $\Delta FfFLOW2$ 株は、イネに対する徒長誘発能力を失ったが、人工培養時の GA 生産性は保持していた。この結果は、*FLOW2* と *FfFLOW2* が植物感染に必要な共通な遺伝子の発現を制御していることを示唆した。

上記の研究によって、イネばか苗病菌は本来宿主範囲の広い、感染能力、植物組織中での増殖能力の低い内生菌であるが、GA 生産能を獲得することによって病原菌化したことが示唆された。また、一般に、植物病原菌では病原力が強いほど適応性が高いと考えられており、*des* と *P450-3* の機能によって病原力が抑制されているという特徴は、本菌の病原性進化の特殊性を示している。イネばか苗病菌は一般的な病原菌に対するこれまでの認識とは異なる“不思議な病原菌”であり、その GA を介した病原菌化現象の解明は病原菌進化に関する新たなモデルを提供すると期待される。

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)

[学会発表](計2件)

神谷信孝, 今崎伊織, 西堀由記, 島岡舞衣, 藤晋一, 小嶋美紀子, 榊原均, 北野英己, 柘植尚志 トマトから分離された *Fusarium fujikuroi* のジベレリン生産性と病原性. 日本植物病理学会大会, 2015年3月31日, 明治大学駿河台キャンパス(東京)(学生優秀発表賞受賞)

島岡舞衣, 西堀由記, 神谷信孝, 藤晋一, 小嶋美紀子, 榊原均, 北野英己, 柘植尚志 イネばか苗病菌のジベレリン生合成酵素遺伝子 *des* および *P450-3* はイネに対する病原力を抑制している. 日本植物病理学会関西支部会, 2013年9月27日, 岡山大学(岡山)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 尚志 (TSUGE TAKASHI)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号: 30192644