

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660038

研究課題名(和文) 染色体構造分析に基づく炭疽病菌のゲノム進化と感染特異性の分化機構研究

研究課題名(英文) Studies on genome evolution and infection specificity of *Colletotrichum* species by cytological karyotyping analysis

研究代表者

久保 康之 (Kubo, Yasuyuki)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：80183797

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)：炭疽病菌の系統分化と感染性の分化の関係を明らかにすることを目的として、細胞学的核型解析を進めた。とくにOrbiculareクレードに属する菌の細胞学的核型解析により、これらが共通して基本染色体数 $n=10$ で高度にAT-richなヘテロクロマチン領域を持つ特徴的な染色体構造を有していることを明らかにした。また、本クレードの炭疽病菌の病原性分化について検討し、アオイ科植物を宿主とする*C. sidae*がキク科に感染すること、宿主がアオイ科でない*C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. spinosum*がアオイ科に感染することを見出し、宿主範囲を部分的に共有している新知見を得た。

研究成果の概要(英文)：To analyze the mechanisms for phylogenetic development of pathogenesis of *Colletotrichum* fungi, we conducted cytological karyotype analysis. Especially, karyotyping of *C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. spinosum*, *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. tebeest* that belong to Orbiculare clade indicated that those fungi conserve karyotype with  $n=10$  chromosomes that contain considerably large AT-rich heterochromatin region. Pathogenesis specificity development of Orbiculare clade fungi was evaluated by inoculation assay. *C. sidae* of which natural host is Malvaceae plant could infect Asteraceae plants and *C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. spinosum* of which natural hosts are not Malvaceae plant infected Malvaceae plant, indicating that Orbiculare clade fungi share plant hosts that might be a potential ancestral common host plants.

研究分野：植物病理学

キーワード：炭疽病菌 ゲノム 染色体 系統進化 病原性 ヘテロクロマチン 感染特異性 付着器

## 1. 研究開始当初の背景

炭疽病菌は9つのクレードに属する700種以上の種から構成され、多くの植物に感染し、多大な病害をもたらしている。Orbicular クレードに属するウリ類炭疽病菌はモデル病原菌として優れた特徴を有し、病原性因子としてメラニン合成、ペルオキシソーム機能、シグナル伝達系、細胞極性形成、細胞周期制御などの先行的な研究蓄積がある。また、ウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)のゲノム解析と染色体の観察から、本菌のゲノムサイズが90Mbに達し、子嚢菌の平均的ゲノムサイズの約2倍に相当すること、また、これまで菌類において報告事例のない極めて明瞭なヘテロクロマチン領域がゲノムを構成する染色体全長の50%にもおよぶ領域を占めて存在することを示す結果を得ている。一方、ゲノムが解明されたトウモロコシ炭疽病菌(*Colletotrichum graminicola*)やアブラナ科野菜類炭疽病菌(*Colletotrichum higginsianum*)を含む大多数の炭疽病菌ではこのヘテロクロマチン領域の存在は認められず、本菌の染色体構造が極めてユニークであることが示唆された。さらに、こうした特徴的な染色体構造はクローバー炭疽病菌(*Colletotrichum trifolii*)やタチアオイ炭疽病菌(*Colletotrichum malvarum*)など系統的に近接した炭疽病菌種に特異的に保存されていることが明らかになり、これらの炭疽病菌が系統的に極めて強固な始原種から分化してきたことが強く示唆された。さらに、この研究結果から現存種において、始原種に帰着するクレードに属する異なる種どうしのヘテロカリオン形成と偽有性生殖の潜在的可能性が示唆された。このようなゲノム構造解析研究による成果とゲノム情報科学的手法により、従来、不可能であった種間レベルの感染特異性決定因子の高精度の分析ができる条件が整った。

## 2. 研究の目的

炭疽病菌のゲノムを構成する染色体構造に基づく精緻な系統分析手法を基盤として、とくに Orbicular クレードに属する7種の炭疽病菌の核型の総合的な解析を行い、Orbicular クレードのゲノム構造の細胞学的解析を総合的に行い、その系統関係を明確にする。また、Orbicular クレードに属する菌はマメ科、アオイ科、ウリ科、キク科植物を宿主植物とする。各炭疽病菌種の感染特異性を決定する。さらに、同属異種間のヘテロカリオン形成と偽有性生殖過程により、感染性に関する異種間染色体の組換え体を獲得し、従来、植物病原系状菌で未解明であった同属内の種間レベルの感染特異性分化機構を遺伝学的に解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では炭疽病菌のゲノム解析情報と細胞学的染色体構造解析にもとづき、ゲノム科

学的手法と分子生物学的手法を駆使して、従来、未解明の同属種間レベルの感染特異性を明らかにする。具体的には炭疽病菌の核型分析、感染実験、ヘテロカリオン・偽有性生殖誘導実験から構成される。

## 実験手法

(1) 核型解析: 培養した菌糸をメタノールにより破裂させ、分裂期の染色体をスライドガラス上に固定した後、これを DAPI/PI により染色し、蛍光顕微鏡により観察した。  
(2) 病原性検定: 系統分化と宿主特異性の関連性を検討するために、各菌株の宿主範囲を明らかにする必要がある。そこで、Orbicular クレードに炭疽病菌の宿主(ウリ科、マメ科、キク科、アオイ科)植物を用い、接種試験を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 染色体構造

Orbicular クレードに属する種として *Colletotrichum orbiculare* に加え、*Colletotrichum trifolii*, *Colletotrichum sidae*, *Colletotrichum spinosum*, *Colletotrichum malvarum*, *Colletotrichum tebestii*, *Colletotrichum lindemuthianum* の核型分析を進め、これら7種の菌の染色体は AT-rich ヘテロクロマチン領域を有し、基本染色体数  $n = 10$  であることを明らかにした。これにより Orbicular クレードは rDNA 配列に基づく分子系統樹に加えて、ゲノム構造的な観点からも極めて密接な関係にある種から構成されていることが示唆された。

また、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) のゲノム解析データ (Gan et al., 2013) からウリ類炭疽病菌のゲノムサイズが 90 Mb を超えることが示されている。このゲノムサイズは一般的な子嚢菌のゲノムサイズの2倍以上に相当し、細胞学的な染色体観察によるヘテロクロマチン領域の存在がこのゲノムインフレーションの原因となっていることが推定された。トウモロコシ炭疽病菌やアブラナ科植物炭疽菌のゲノムサイズは 50Mb 程度であり、このヘテロクロマチン領域の存在は認められていない。Orbicular クレードにおいてはこのクレードの成立過程でヘテロクロマチン領域の増幅し、その後、感染性の分化が行われた可能性が示唆された。

### 2) 感染特異性の検定

Orbicular クレードの系統と病原性分化の関係について検討するため接種試験を行った。*Colletotrichum malvarum* の分離宿主ハナアオイに対する接種試験を行ったところ、Orbicular クレードに属する6種が顕著な病原性を示した。また、アオイ科のキンゴジカを分離宿主とする *Colletotrichum sidae* がキク科のオナモミに感染すること、分離宿主がア

オイ科でない *Colletotrichum orbiculare*, *Colletotrichum trifoli*, *Colletotrichum spinosum* がアオイ科のハナアオイに感染することを見出した。以上より、Orbiculare クレードに属する炭疽病菌が宿主範囲を部分的に共有していることが示された。また、Orbiculare クレードに属する 7 種はマメ科、キク科、ウリ科、アオイ科のいずれかの植物を宿主としているが、とくにアオイ科植物が共通宿主としての性質を有していたことから、アオイ科植物に対する感染性を持つ始原種から病原性が分化した可能性を想定することができた。一方、病原菌の分子系統樹に基づく系統関係と宿主特異性の分化には直線的な相関は見られないことが示された。

3) ヘテロカリオン、偽有性生殖の検定  
ウリ類炭疽病菌と、本菌と染色体構造が酷似し、系統樹において近縁であるタチアオイ炭疽病菌(*Colletotrichum malvarum*)、クローバー炭疽病菌(*Colletotrichum trifolii*)さらに、オナモミ炭疽病菌(*Colletotrichum spinosum*)を加え、これらの同属種関係にある菌の感染特異性分化機構を解明するために、ヘテロカリオン及び偽有性生殖系の確立を行った。まず、ヘテロカリオン及び偽有性生殖の選抜・評価を薬剤耐性と蛍光標識により行うために、供試菌において蛍光タンパク質(GFP、RFP)融合ヒストン発現株の獲得を行った。獲得した機能獲得株において 3 つの融合実験を設定した。

第一は孢子同士が形成する融着管(CATs:Conidial Anastomosis Tubes)を利用した CATs 融合実験を行った。その結果、クローバー炭疽病菌種内において系統を越えた CATs の形成を確認できたが、本実験による薬剤耐性を示す菌の獲得はできなかった。

第二は、供試菌の中でベンサミアナタバコに感染するウリ類炭疽病菌、タチアオイ炭疽病菌、オナモミ炭疽病菌の機能獲得株を利用し、ベンサミアナタバコの植物体上での融合実験を行った。その結果、ウリ類炭疽病菌とタチアオイ炭疽病菌を共接種した接種葉からは二重選抜培地において生育菌糸が確認された。観察の結果、菌糸細胞で GFP において標識された核と、その細胞質では RFP の蛍光が観察され、細胞融合によるヘテロカリオンが生じた可能性が考えられた。

第三として、機能獲得株を利用したプロトプラスト-PEG 法による融合実験を行った。その結果、ウリ類炭疽病菌とクローバー炭疽病菌 French 系統、タチアオイ炭疽病菌において選抜培地での生育菌糸が観察された。さらに、生育菌糸の蛍光顕微鏡観察の結果、生育が観察された菌糸から GFP と RFP により標識された核をもつ菌糸を観察する事ができた。この結果から、ウリ類炭疽病菌とクローバー炭疽病菌 French 系統、タチアオイ炭疽病菌においてヘテロカリオンが起こった可能性が考えられた。

しかしながら、いずれの実験系においても、

耐性選抜マーカー導入による薬剤耐性と蛍光タンパク質検定にもとづくヘテロカリオンの安定性については、なお、検討の必要があり、偽有性生殖については、成功には至らなかった。

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2件)

Yasuyuki Kubo and Yoshitaka Takano (2013) Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. Journal of General Plant Pathology, Vol. 79, 2013, pp. 233-242. DOI: 10.1007/s10327-013-0451-9 (査読有)

Yasuyuki Kubo (2013) Function of peroxisomes in plant-pathogen interactions. In "Peroxisomes and Signaling" Luis A. del Río ed. Subcellular Biochemistry XII, Springer, pp329-345. (査読無)

[学会発表](計4件)

小川真実, 田中 薫, 上中谷瞳, 山下 純, Gan Pamela, 白須 賢, 多賀正節, 久保康之 *Colletotrichum orbiculare* species complex に属する炭疽病菌の細胞学的核型解析と宿主特異性の検討, 日本植物病理学会平成 27 年度大会, 平成 27 年 3 月 28 日, 明治大学

Masatoki Taga, Hitomi Kaminakaya, Kaoru Tanaka and Yasuyuki Kubo, Cytological analysis of karyotype evolution in the genus *Colletotrichum*. 16<sup>th</sup> International Congress for Plant-Microbe Interactions 2014, July 6-July 10. Rhodos, Greece

上中谷瞳, 小川真実, 久保康之, 多賀正節 *Colletotrichum spinosum* の細胞学的核型解析 日本植物病理学会 平成 26 年度大会, 平成 26 年 6 月 2 日, 札幌コンベンションセンター

上中谷瞳, 久保康之, 多賀正節 *Colletotrichum destructivum* の細胞学的核型解析 日本植物病理学会関西西部会 平成 25 年度大会, 平成 25 年 9 月 26 日, 岡山大学

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

病原糸状菌の分子パターンと植物の免疫 (<http://ykubo.blog.eonet.jp>)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 康之 (KUBO YASUYUKI)  
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号：80183797

### (2) 研究分担者

該当なし