

令和元年6月17日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07612

研究課題名(和文) ムギ類赤かび病菌における新規宿主内伸長遺伝子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel gene involving spread of Fusarium head blight fungus in the host plant

研究代表者

須賀 晴久 (SUGA, Haruhisa)

岐阜大学・研究推進・社会連携機構・准教授

研究者番号：20283319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ムギ類赤かび病菌は、ムギに病害だけでなく、カビ毒汚染を起こすことで大きな問題となっている。本菌においては宿主内菌糸伸長能を失った自然変異株0233007が見出されている。連鎖解析の結果、この株の原因変異は第1染色体の約195Kb中にあることが判明し、その領域中に2塩基欠失による読取枠の早期停止が生じているFGSG00739遺伝子が見出された。NADPHオキシダーゼをコードすると推定されているFGSG00739遺伝子を野生株からクローニングして0233007株に導入したところ、宿主内菌糸伸長能の回復が見られた。従って、FGSG00739がムギ類赤かび病菌の宿主内菌糸伸長に関わる遺伝子と判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムギには赤かび病に対する有効な抵抗性品種がなく、世界中のムギが常に赤かび病による減収とカビ毒汚染の脅威にさらされている。本研究ではムギ類赤かび病の病原菌が宿主内で菌糸を伸長させるのに必要な遺伝子を解明した。植物病原菌の約7割はムギ類赤かび病の病原菌と同じ糸状菌であり、本研究の成果は、糸状菌全体の植物病原性機構の解明につながると共に新たな防除法の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Fusarium head blight fungus causes not only disease but also mycotoxin contamination on wheat in the world. A natural pathogenicity mutant, 0233007 strain, that could not spread beyond the inoculation point in the host was detected from our fungal library. The mutation locus was mapped to 195Kb-span in the chromosome No. 1 by linkage analyses. It was found that 0233007 strain carries two nucleotide deletion in the FGSG00739 gene that is located in the mapped region. FGSG00739 encoding a putative NADPH oxidase was cloned from a wild type strain and introduced into the mutant strain by transformation. Introduction of the FGSG00739 restored pathogenicity of the mutant. These results indicate that FGSG00739 is involved in spreading of Fusarium head blight fungus in the host plant.

研究分野：植物病理学

キーワード：菌類 遺伝子 マイコトキシン ムギ類赤かび病 Fusarium

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ムギ類赤かび病菌は、世界中のムギに病害をもたらすだけでなく、収穫ムギにカビ毒汚染を起こすことで大きな問題となっている。カビ毒は製パンなどの加熱でも毒性が下がらないため、唯一の汚染防止対策は、圃場において赤かび病菌をムギに感染させないことである。しかし、赤かび病菌はムギの開花期に、特に高湿度で感染することが知られており、日本はその時季が梅雨と重なるために被害が大きくなる。さらに、ムギには赤かび病に対する強い抵抗性品種がなく、日本では薬剤による防除が行われているが、近年主要薬剤に対する耐性菌が出現している。

本菌については被害の重大性から、世界中で病原性機構の解明が進められてきた。その結果、シグナル伝達やアミノ酸合成などに関わる遺伝子が病原性に関与すると報告されている。一方、圃場から分離される菌の病原性は様々であるが、遺伝子レベルでその原因は分かっていない。

我々はこれまで圃場から多数の赤かび病菌を分離して極端に病原性が弱く、宿主のムギ体内で伸長する能力を欠いた自然変異株(菌糸伸長能喪失株)を複数見出ししてきた。更にその一株について、細胞表面に存在するグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカータンパク質の遺伝子欠失が菌糸伸長能喪失の原因であることを明らかにした。一方、保有する菌糸伸長能喪失株の中にはそれと原因が異なるものがあることが判明した。

### 2. 研究の目的

本課題の目的は、ムギ類赤かび病菌において、GPIアンカータンパク質遺伝子とは異なる新たな宿主内菌糸伸長遺伝子を解明することである。本研究で明らかになる遺伝子は、新たな薬剤開発の格好の標的になる。また、植物病原菌の約7割は糸状菌であり、本研究の成果は、他の多くの病原性糸状菌の病原性機構の解明と防除法の開発にも寄与することになる。

### 3. 研究の方法

ムギ類赤かび病菌はコムギの穂に接種すると、接種部から菌糸がコムギ穂内を伸長して病徴が穂全体に広がる。しかし、圃場から分離されたムギ類赤かび病菌の中には、接種部にしか病徴が見られない株がある。そのような株のうち、0225022株はGPIアンカータンパク質遺伝子の喪失がその原因であることが判明しているが、本課題ではそれとは菌糸伸長能喪失の原因が異なる0233007株を使用した。

#### (1) 菌糸伸長能喪失株と野生株の交配

連鎖解析により菌糸伸長能喪失株で異常となっているゲノム上の位置を特定するため、菌糸伸長能喪失株と野生株の交配子孫株を取得する。交配にあたっては自家受精や分生胞子由来の株と他家受精由来の子孫株を培地上で識別する必要があるため、菌糸伸長能喪失株と野生株で異なるタイプの硝酸利用欠損変異体を用意した。それらに交配誘導処理を行い、交配子孫株を取得した。得られた交配子孫株については、コムギの穂への接種試験により、宿主内進展能を調べた。

#### (2) 宿主内菌糸伸長能に連鎖するDNAマーカーの探索

連鎖解析によって菌糸伸長能喪失株で異常となっているゲノム上の位置を特定するため、シーケンスタグ化(塩基配列が分かっている)DNAマーカーを準備する必要がある。これまでムギ類赤かび病菌の研究を通じて作成されてきたマイクロサテライトマーカーの中から、親株とした菌糸伸長能喪失株と野生株で多型を示すマーカーを選抜した。また、原因が存在すると予想された領域に、新たにPCR-RFLPマーカーを設定して、子孫株のマーカーデータを取得した。

#### (3) 候補遺伝子の絞り込みとその導入株の作成

菌糸伸長能喪失株の全ゲノム塩基配列情報を取得した。そこから(2)で宿主内進展能と強い連鎖関係にあるDNAマーカーから特定したゲノム領域に存在するはずの遺伝子について、読取枠に大きな異常が見られるものを探し出した。更に、菌糸伸長能喪失株において読取枠に大きな異常が見られた遺伝子の中に、既報の病原性関連遺伝子に該当するものがないかを調査した。その結果、NADPHオキシダーゼをコードするFGSG00739が原因候補遺伝子として見出された。野生株からこの候補遺伝子をクローニングして、菌糸伸長能喪失株に形質転換で導入した。

#### (4) 候補遺伝子導入株の性状調査

候補遺伝子導入株をコムギ穂に接種して、元の菌糸伸長能喪失株と病徴の広がりが異なるかを調べた。また、菌糸伸長能喪失株、野生株、候補遺伝子導入株について、寒天培地上に増殖させたコロニーをNitrotetrazoium Blue Chloride (NBT)で染色して、NADPHオキシダーゼ活性が検出される様子に違いがないかを観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 菌糸伸長能喪失株と野生株の交配

菌糸伸長能喪失株と野生株を交配させ、子孫株を43株得た。これらをコムギの穂に接種した結果、菌糸伸長能を持つものが23株、持たないものが20株であった。

#### (2) 宿主内菌糸伸長能に連鎖するDNAマーカーの探索

本菌の連鎖地図作成を通じて開発してきたシーケンスタグ化マーカーから、ゲノム全体に散在しており、かつ、交配に用いた菌糸伸長能喪失株と野生株で識別可能な25個のマーカーを選抜した。これらのマーカーを使って20子孫株のゲノムを分析した結果、0233007株における

菌糸伸長能喪失の原因は第 1 染色体上の VNHK1041 マーカーから VNHK957 マーカーの間に存在すると予想された。その領域について新たな PCR-RFLP マーカーの設定と子孫株におけるマーカーデータの取得を繰り返した。その結果、最終的に菌糸伸長能喪失に完全連鎖を示す 4 つのマーカー (PRHS892/*Nsi*I、PRHS859/*Xho*I、PRHS894/*Mse*I、PRHS896/*Hha*I) が見出された(図 1)。

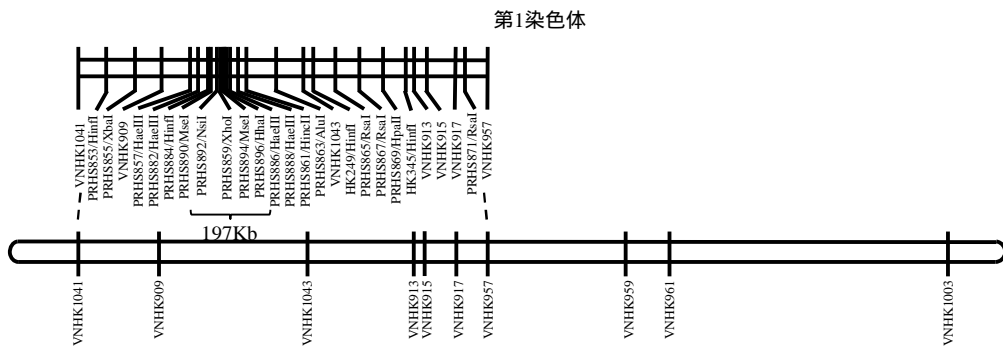


図 1. 菌糸伸長能と強い連鎖関係が認められたゲノム領域(VNHK はマイクロサテライトマーカー、PRHS は PCR-RFLP マーカー。連鎖関係が認められた約 197Kb 中には、全ゲノムデータベースで 82 個の遺伝子が検出されている。)

(3) 候補遺伝子の絞り込みとその導入株の作成

ムギ類赤かび病菌の野生株のゲノムデータベースによれば、(2)で絞り込まれたゲノム領域 197Kb には 82 個の遺伝子が存在する。0233007 株のゲノムシーケンスをもとに、それらの遺伝子の読取枠を調べたところ、*FGSG00728*、*FGSG00739*、*FGSG00785* に大きな異常が見られた。

(4) 候補遺伝子導入株の性状調査

読取枠に大きな異常が見られた 3 つの遺伝子のうち、NADPH オキシダーゼをコードすると推定されている *FGSG00739* は病原性に関連することが報告されており(Wang *et al* 2014)、0233007 株の場合 2 塩基欠失によるフレームシフトで読取枠の早期停止が生じている(図 2)。そこで、上流域と下流域を含むように *FGSG00739* を野生株から PCR で増幅してプラスミドベクターに挿入し、形質転換で 0233007 株に導入した。得られた *FGSG00739* 導入株をコムギ穂に接種してみたところ、接種部位からの病徴の広がり認められた。従って、0233007 株における菌糸伸長能喪失は *FGSG00739* の読取枠の異常によることが判明した。*FGSG00739* の翻訳産物と推定されている NADPH オキシダーゼの活性を NBT 染色により寒天培地上に増殖させたコロニーで検出したところ、野生株ではコロニー周縁部に、0233007 株ではそれより少し内側に活性を意味する紫色の沈着が認められた。*FGSG00739* 導入株では元株の 0233007 株とは異なり、野生株同様、周縁部に紫色の沈着が認められた。以上の結果から菌糸先端部の NADPH オキシダーゼ活性が宿主内菌糸伸長に必要であることが示唆された。

```

ATGGGGTGGCCAACTCGGTTGCTCGAATTAAATAAAGAGCAGTTTGTACTGGCAAAGCTCTACTTTCTTCTTCTGGACGTTTCACTGGGGTATCTI
M G S Y Q L G F V E L I K K Q F V P G R L L Y H F L F W T F H W G I
TTGGCTTAGGATGGTgagttgaaacaactccttgcgaacctctcatcaactaacagctttatcaagGTGGAAGCAAGCTGTAGACCCCTAGACTCGCAG
F A Y G W
GTCTTAACAGGCTCAAAATCTCAGTATGGATCTCACAGAGGTGCTGGTGTAGTTCTCAGTGTGGCATGCTGCTATCTCCCTCCCGTATGCCGAACCGT
G L N F L K F S V W L R G R A G L V L S V D C M L T L L P V C R T V
TATCCGATGGTTCGACCCCAAGATTCGCTTCTCCTCGATGGAACCTGTGGATGCAACCGCAGCTTGCCTATTCATGTCTCTTCCACTGCCTT
M R W V R P E K I R F L D E N L W M H R Q L A Y S M L T C T L T C A C T G C C T T
CACACAGCGCTCACTAAGCTCACTTTTACACAGCTCGAAATCACTCAGATCCGACCGCTTACGCTCTCAGATTCACTATGCTCAGCGCTGGTGGTATCA
H T G A H Y V N F I T T A C C G T C G A A T C A C T C A G A T C C G A C C G T T A C G G T C T C A G A T T C A C T A T G C T C A G C G T
CTGGTCACTCATGCTCTTCGCTGCTCATGTTTACAGCGCCCAAGCTGCTATCGCTAATCAACATCGTTTGGAGACGTTTGGTACACTCACCATCT
T G H I M L L C M L M F T S A H A R I R Q Q S P E T F W Y T H H L
CTTCACTCCCTTCTCTGCTGCCTTCAACCCACAGTGGGATGTTTCTGCTGCTCACTCCGCTTCTCCACTTTCGCGGACGACGAGTTCG
F I P P F L G L Y T H T V G C F V R D T P E A P S P F F A G D E F W
GAGCCTGATGTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
E H C I G Y L G W R W E L W T G G A Y L L E R L W R E V R A R R S
CAAAGATTACCAGGCTCGTCCGCTAAGCTCGTGTAGAGATTTCAGTTCAACAGGCTCTTTCAAGTCAAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
K I I T R V V R H F P Y D V V E I Q F N K P S P K Y K A G Q W L F L Q
GGTAGCTTCCCTTCAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
V P S L S K Y Q W H P F T I T S C P F D P (Y V S V H V R Q V G D F)
ACCCAGAGAGCTGGTGATGCCCTTGGTCCGCTGTCTCAGGCCAAGCTTTACGATGATGTTGACCCCTGGAATGTACGAGGTTGCTCTCAGAACG
T R E L G D A L G A G A A Q A K L Y D D V D P M G M Y E V A L Q N
GTGACCAAGTCCGCTCTTGAATGATGGACTTACGGTGGCTGCTGAGGATGTTTTCGAGAACAAATCGCTGTCTTATCGGTACTGGTATGG
G D Q M P A L R I D G P Y G A P A E D V F E N E I A V L I G T G I G
TGTCACCTCCCTGGCTGTCTCATGAACATCTGGCATTCCCGCAACTCCTCCCAACCTCCCGCTGCTTTCGCGGAGTGCAGTTTCTGGGTTG
V T P W A A I L K N I W H L R N S P N P P R R L R R V E F I W V C
AAGGATACCTGTTCTTCAGAGTGGTTCCAGACTCTGCTGTCTCTTGGAGGACAGTCCAACGAGACGACGATGCTGCGCAGCAGGAGTCCGAGT
K D T G S F E W F Q T L L S S L E E Q S N E A A R M P G S T G V E
TCTCAAGATCCACACCTATCTCACACAGAAGCTGGATATCGACACTGCCAGAACATTTGCTCCCAACAGTTCGGCTCTCAGATGGATCCCTCACAGA
F L K I H T Y L T Q K L D I D T A Q N I V L N S V G S Q M D P L T E
ACTAACAACGACAACTTTGGTGCACCTGATTTCCGCCGCTATTACACAACTGCGAAACGCTATTTGGACCGCACATCTTAACGGTCTAGAG
L Q S R T N F R P D F P R L F T T M R N G I L D R T Y L N G L E
TCACACATTCGCACAGATTGGTGTATTCTGTTGGTCTCTCAGCTGCTGgttaagttacattctaaacccatgctattctaaaatgcatgctaaaca
S H I R T T V G V Y F C G P S A A
aatatcagCTCGTGTATTTAACTTTCATGTAAGCAGCAACCCGTGCCGACCTGGATTTCCGTTTCTGGAAGGAGCACTTCTAA
A R D I K L A C K A A T V P D V D F R F W K E H F *)
    
```

図 2. 0233007 株の *FGSG00739* に見られた読取枠の異常(上段は塩基配列で大文字がエクソン、小文字がイントロン。下段はアミノ酸配列。矢印の位置に 2 塩基欠失があり、フレームシフトにより読取枠が停止している。\* は停止コドン。2 塩基欠失がなかった場合に翻訳されるはずのアミノ酸配列を括弧に示した。)

< 引用文献 >

Wang L, Mogg C, Walkowiak S, Joshi M, Subramaniam R, Characterization of NADPH oxidase genes *NoxA* and *NoxB* in *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 36, 2014, 12-21.

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 3 件)

Mizutani Y, Abraham A, Uesaka K, Kondo H, Suga H, Suzuki N, Chiba S, Novel mitoviruses and a unique tymo-like virus in hypovirulent and virulent strains of the Fusarium Head Blight fungus, *Fusarium boothii*. Viruses, 査読有, 10, 2018, 584. DOI: 10.3390/v10110584

Suga H, Kageyama K, Shimizu M, Hyakumachi M, A natural mutation involving both pathogenicity and perithecium formation in the *Fusarium graminearum* species complex. G3: Genes Genomes Genetics, 査読有, 6, 2016, 3883~3892. DOI: 10.1534/g3.116.033951  
Hieno A, Naznin HA, Suga H, Yamamoto Y, Hyakumachi M, Specific detection of Type 1 and Type 2 isolates of *Pyrenochaeta lycopersici* by loop-mediated isothermal amplification reaction. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil&Plant Science, 査読有, 66, 2016, 353~358. DOI: 10.1080/09064710.2015.1120341

### [学会発表](計 12 件)

水谷行善, Adane Abraham, 上坂一馬, 近藤秀樹, 須賀晴久, 鈴木信弘, 千葉壮太郎, *Fusarium boothii* 病原性衰退株 BL13 に感染する新規 Tymovirales 目ウイルスの性状解析. 日本植物病理学会大会, 2019 年

奥村理奈, 井川真帆, 平田有紀, 清水将文, 景山幸二, 須賀晴久, ムギ類赤かび病菌の第一染色体における病原性関連領域の詳細マッピング. 日本植物病理学会大会, 2018 年

Okumura R., Ikawa M., Hirata Y., Shimizu M., Kageyama K., Suga H., Genetic mapping of chromosome No.1 region associated with pathogenicity in Fusarium head blight pathogen. International Symposium on Innovative Crop Protection for Sustainable Agriculture 2018, 2018

Suga H., Molecular characterization of *Fusarium fujikuroi* in Japan. International Symposium on Innovative Crop Protection for Sustainable Agriculture 2018, 2018

須賀晴久, イネばか苗病菌 *Fusarium fujikuroi* に見られるジベレリン産生の多様性とその要因. 第 81 回日本マイコトキシン学会学術講演, 2018 年

Mizutani Yukiyo, Abraham M Adane, Suga Haruhisa, Suzuki Nobuhiro, Chiba Sotaro, Characterization of mitoviruses found in Ethiopian isolates of *Fusarium* spp.. The Fourth International Mycovirus Symposium 2017

須賀晴久, 川畑文子, 清水将文, 景山幸二, イネばか苗病菌 *Fusarium fujikuroi* のチオファネートメチル耐性と 2 チュープリン遺伝子の変異. 日本植物病理学会関西西部会, 2017 年  
稲垣晋, 長坂拓弥, 今崎伊織, 藤晋一, 柘植尚志, 清水将文, 景山幸二, 須賀晴久, イネばか苗病菌 *Fusarium fujikuroi* の G グループと F グループのジベレリン産生力の違いの原因遺伝子解明. 日本植物病理学会関西西部会, 2017 年

水谷行善, 須賀晴久, 鈴木信弘, 千葉壮太郎, *Fusarium boothii* BL13 分離株に存在する 3 種の dsRNA 成分の生物学的性状. 日本植物病理学会大会, 2017 年

須賀晴久, 船坂美佳, 川畑文子, 清水将文, 景山幸二, ある一農家が保有する複数のイネばか苗病発生水田から分離した *Fusarium fujikuroi* の個体分析. 日本植物病理学会大会, 2017 年

Suga Haruhisa, The gene polymorphisms involving fumonisin producibility in *Fusarium fujikuroi*. International Symposium of Mycotoxicology 2016, 2016

奥村理奈, 井川真帆, 平田有紀, 清水将文, 景山幸二, 須賀晴久, マッピングで新たに見出されたムギ類赤かび病菌の病原性関連ゲノム領域. 日本植物病理学会関西西部会, 2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。